

Massenspektrometrische Charakterisierung von labilen Protein- und Peptidphosphorylierungen

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m

(Dr. rer. nat.)

im Fach Chemie

Eingereicht an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
der Humboldt-Universität zu Berlin, Institut für Chemie
von

M. Sc. Chemie Martin Penkert

Präsidentin der Humboldt-Universität zu Berlin
Prof. Dr.-Ing. Dr. Sabine Kunst

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
Prof. Dr. Elmar Kulke

Gutachter: 1. Prof. Dr. C. P. R. Hackenberger
 2. Prof. Dr. K. Pagel
 3. Prof. Dr. M. Linscheid

Tag der mündlichen Prüfung: 17.04.2019

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juni 2015 bis Mai 2018 am Leibniz-Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie (FMP) im Fachbereich Chemische Biologie in der Arbeitsgruppe Massenspektrometrie unter Leitung von Dr. Eberhard Krause und Prof. Dr. Christian Hackenberger angefertigt.

**„Am Abgrund der deutschen Geschichte und unter der Last der Millionen
Ermordeten tat ich, was Menschen tun, wenn die Sprache versagt. [...] Mein
eigentlicher Erfolg war, mit dazu beigetragen zu haben, dass in der Welt,
in der wir leben, der Name unseres Landes und der Begriff des Friedens
wieder in einem Atemzug genannt werden können.“**

Willy Brandt

(Bürgermeister von Berlin, Bundesaußenminister, Bundeskanzler, Man of the Year des Time Magazin,
Ehrendoktor der University of Oxford und Friedensnobelpreisträger)
in Erinnerungen an den Kniefall von Warschau und den Erhalt des Friedensnobelpreises

Kurzfassung

Kovalente posttranslationale Modifikationen (PTMs) beeinflussen die Struktur und Funktion von Proteinen. Zu den bedeutendsten PTMs zählt die Proteinphosphorylierung. Sie reguliert nahezu alle Bereiche der Zellbiologie und ist u.a. für Signalübertragungen, die Kontrolle von Enzymaktivitäten, Apoptose und Protein-Protein-Wechselwirkungen verantwortlich. Neben Phosphorylierungen an Serin-, Threonin- und Tyrosinresten sind in der näheren Vergangenheit wenig untersuchte, labile Phosphorylierungen an Arginin-, Cystein-, Histidin- und Lysinresten, sowie Pyrophosphorylierungen an Serin- und Threoninbausteinen in den Fokus der Wissenschaft gerückt. Trotz großer Fortschritte auf dem Gebiet der Massenspektrometrie (MS) von Proteinen und Peptiden bleibt die Analyse dieser empfindlichen Modifikationen mittels Tandem-MS eine große Herausforderung. Gebräuchliche Fragmentierungstechniken, wie kollisions-induzierte Dissoziation (CID) und höher energetische kollisions-induzierte Dissoziation (HCD) verursachen in beträchtlichem Umfang die Abspaltung von Phosphatgruppen (Neutralverluste) und erschweren damit deren eindeutige Lokalisierung.

In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, dass Elektronentransferdissoziation (ETD) in Kombination mit einer zusätzlichen HCD Aktivierung (EThcD) in der Lage ist, Peptide mit labilen Phosphorylierungen in der Seitenkette unter Erhalt der Modifikation zu fragmentieren. Im Gegensatz zur herkömmlichen ETD werden mit dieser Technik höhere Sequenzabdeckungen sowohl auf Peptid als auch auf Proteinebene erzielt. Außerdem ermöglicht EThcD die zuverlässige Positionsbestimmung labiler Modifikationen von kurzen, doppelt protonierten Peptidionen.

In verschiedenen *bottom-up*-proteomischen Ansätzen konnte gezeigt werden, dass EThcD eine zweifelsfreie Identifizierung einer natürlich vorkommenden Cysteinphosphorylierung ermöglicht. Das entwickelte Verfahren ermöglicht weiterhin die eindeutige Charakterisierung von Produkten und Nebenreaktionen bei Synthesen zur positionsspezifischen Einführung von Proteinpyrophosphorylierungen und Proteincysteinphosphorylierungen. Außerdem waren sie essentiell für die Charakterisierung artifizierlicher Modifikationen in Antikörper-Wirkstoff-Konjugaten (ADC) und deren Derivaten.

Die Untersuchung labiler Modifikationen beschränkte sich jedoch nicht nur auf die Peptidebene. Eigens für die Bestimmung des Wirkstoff-Antikörper-Verhältnisses (DAR), ein wichtiger Parameter bei der Charakterisierung von ADCs, und zur Quantifizierung von Nebenreaktionen wurde eine LC-MS-Methode zur Analyse intakter Proteine entwickelt und erfolgreich angewendet.

Außerdem wurden Methoden für die Identifizierung von endogenen Lysinphosphorylierungen entwickelt. Unter dem Gesichtspunkt der Labilität wurde für die Proteomanalyse von Lysinphosphorylierungen ein *bottom-up*-Phosphoproteomikansatz etabliert, der eine effiziente Anreicherung, eine leistungsfähige Fraktionierungstechnik und eine hochselektive massenspektrometrische Methode beinhaltet. Das MS-Verfahren beruht auf der Generierung eines diagnostischen Phospholysinimmoniumions unter HCD-Bedingungen, welches im zweiten Schritt die Erfassung eines zusätzlichen EThcD-

Spektrums desselben Precursorions veranlässt (triggert). Diese Strategie gewährleistete eine schnelle, empfindliche und zweifelsfreie Identifizierung von lysinphosphorylierten Peptiden.

Darüber hinaus wird im Zuge dieser Arbeit gezeigt, dass sich pyrophosphorylierte Peptide unter CID-Bedingungen in ihrem Neutralverlustmuster von den massengleichen (isobaren) diphosphorylierten Peptiden unterscheiden. Dieses Verhalten stellt einen Schlüsselschritt in einer spezifischen, neutralverlustgetriggerten EThcD Methode dar, welche die zweifelsfreie Identifizierung von Pyrophosphorylierungen, ohne Kompromisse in Bezug auf Geschwindigkeit oder Empfindlichkeit eingehen zu müssen, ermöglicht. In Kombinationen mit verschiedenen Anreicherungs- und Fraktionierungstechniken konnte damit in Hefezellen und humanen embryonalen Nierenzellen der Nachweis der ersten Proteinpyrophosphorylierungen, einer neuen endogenen posttranslationalen Modifikation, erbracht werden.

Schlagworte: Cysteinphosphorylierung, Lysinphosphorylierung, Pyrophosphorylierung, EThcD, Triggermethoden, neue endogene PTMs

Abstract

Covalent posttranslational modifications (PTMs) influence the structure and function of proteins. Protein phosphorylations belong to the most important PTMs, regulating almost all area of cell biology, including cell signaling, regulation of enzyme activity, apoptosis and protein-protein interactions. Beside phosphorylation of serine, threonine and tyrosine residues, rarely characterized labile phosphorylations, for instance phosphorylations of arginine, cysteine, histidine and pyrophosphorylations of serine and threonine residues got into the focus of science, driving the development of powerful mass spectrometry techniques (MS) to. However, the analysis of those delicate modifications via tandem mass spectrometry remains a challenge. Common fragmentation techniques such as collision induced dissociation (CID) and higher-energy collision dissociation (HCD) cause to an considerable extent the cleavage of phosphate groups (neutral losses), hampering unambiguous localization of the modification site.

In the present work, it is shown that electron-transfer dissociation (ETD) combined with HCD supplemental activation (EThcD) is able to fragment peptides with labile phosphorylations at the side chains without losing the modification. In contrast to ETD, this technique provides higher sequence coverages of proteins and peptides. In addition, EThcD allows confident modification site assignment of short doubly protonated peptide ions.

In several bottom-up proteomic approaches, EThcD allowed the reliable identification of a naturally occurring cysteine phosphorylation, the characterization of products and off-target reactions during the site specific introduction of protein pyrophosphorylations and protein cysteine phosphorylations. Moreover, they played an essential role in characterizing artificial modifications of antibody drug conjugates (ADC) and its derivatives.

Additionally, studies of labile modifications were not restricted on peptides. To determine the drug-to-antibody ratio (DAR), an important parameter during ADC characterization, and to quantify the degree of side reactions a HPLC-MS method for assessing intact proteins was developed.

In addition, methods for identification of lysine phosphorylations were developed. For the proteome wide analysis of lysine phosphorylations, considering the lability of the modification, a bottom-up phosphoproteomic approach, consisting of an efficient enrichment procedure, a powerful fractionation technique and a highly selective mass spectrometry method was established. The MS-method relies on the generation of diagnostic phospholysine immonium ions during HCD, which trigger in a second step an additional EThcD spectrum of the same precursor ion. This strategy ensures the fast, sensitive and confident identification of lysine phosphorylated peptides.

Furthermore, the present work shows that isobaric pyro- and diphosphorylated peptides differ in their neutral loss pattern during CID. This behavior was a key step in a specific neutral loss triggered EThcD method, which allows the reliable identification of pyrophosphorylations without compromising in sensitivity and speed. In combination with a pyrophosphopeptide specific enrichment procedure

and various fractionation techniques, this method allowed the identification of the first protein pyrophosphorylations, a new endogenous PTM, in yeast and human embryonic kidney cells.

Keywords: cysteine phosphorylation, lysine phosphorylation, pyrophosphorylation, EThcD, trigger methods, new endogenous PTMs

Inhaltsverzeichnis

Kurzfassung	i
Abstract	iii
Inhaltsverzeichnis	v
1 Einleitung und aktueller Kenntnisstand.....	1
1.1 Die Proteinphosphorylierung - eine posttranslationale Modifikation	1
1.1.1 Arten von Phosphorylierungen	3
1.1.2 Labilität von Phosphorylierungen	6
1.1.3 Synthesestrategien zur Darstellung labiler Peptidphosphorylierungen	8
1.2 Analyse von Protein- und Peptidmodifikationen.....	13
1.2.1 <i>Bottom-up</i> und <i>Top-down</i> -Proteomik	13
1.2.2 Verfahren zur Anreicherung von Phosphopeptiden	16
1.2.3 Selektive Anreicherung labiler Phosphorylierungen	18
1.2.4 Trennungs- und Fraktionierungstechniken	21
1.2.5 Tandemmassenspektrometrische Analyse von Proteinen und Peptiden.....	24
1.2.5.1 Kollisionsbasierte Fragmentierungstechniken.....	26
1.2.5.2 Analyse von Phosphopeptiden mit kollisionsbasierten Fragmentierungstechniken..	28
1.2.5.3 Elektronenbasierte Fragmentierungstechniken.....	30
1.2.5.4 Elektronenbasierte Hybridaktivierungstechniken.....	32
1.2.5.5 Analyse von Phosphopeptiden mit elektronenbasierten Fragmentierungstechniken	33
1.2.6 Ionenmobilität zur Trennung isobarer Peptide	36
1.2.7 Quantifizierung in der Proteomik	37
1.2.8 Bioinformatische Auswertung phosphoproteomischer Experimente	40
2 Zielstellung.....	41
3 Ergebnisse und Diskussion.....	42
3.1 Tandem-MS von cysteinphosphorylierten Peptiden	42

3.1.1	CID-Fragmentierung cysteinphosphorylierter Peptide.....	42
3.1.2	HCD-Fragmentierung cysteinphosphorylierter Peptide	44
3.1.3	EThcD-Fragmentierung cysteinphosphorylierter Peptide	45
3.1.4	Charakterisierung einer endogenen Cysteinphosphorylierung	46
3.2	Tandem-MS von doppelt geladenen, labil phosphorylierten Peptiden	51
3.2.1	Vergleich ETD-und HCD-Fragmentierung labil phosphorylierter Peptide.....	51
3.2.2	EThcD-Fragmentierung doppelt geladener, labil phosphorylierter Peptide.....	54
3.2.3	Bioinformatische Evaluierung der HCD- und EThcD-Spektren	58
3.2.4	Optimierung der EThcD-Bedingungen	61
3.2.5	Fragmentionenserien während EThcD	64
3.3	Charakterisierung von Proteinmodifikationen.....	65
3.3.1	HPLC-MS-Methode zur Charakterisierung intakter Proteine	65
3.3.2	<i>Bottom-up</i> -Ansatz zur Charakterisierung von Proteinmodifikationen	66
3.3.3	Charakterisierung einer pyrophosphorylierten Myoglobinmutante.....	67
3.3.4	Charakterisierung einer cysteinphosphorylierten Angiogeninmutante	70
3.3.5	Charakterisierung von Antikörper-Wirkstoff-Konjugaten	74
3.3.6	<i>Top-down</i> -Ansatz zur Charakterisierung von Myoglobin	79
3.4	Grenzen der EThcD-Fragmentierung	82
3.5	Strategien zur Identifizierung endogener Lysinphosphorylierungen.....	84
3.5.1	Proteomikansatz zur Identifizierung von pLys auf dem Histon H1	86
3.5.1.1	Derivatisierung von Histonmodellpeptiden.....	86
3.5.1.2	Derivatisierung von lysinphosphorylierten Histonmodellpeptiden	88
3.5.1.3	Derivatisierung von Histon H1	89
3.5.1.4	WCX-Chromatographie zur Trennung von Proteinen.....	90
3.5.2	Proteomweite Identifizierung labiler Phosphorylierungen	92
3.5.2.1	Basische RP-Chromatographie zur Fraktionierung komplexer Peptidgemische.....	92
3.5.2.2	Vergleich von saurer und basischer RPLC als erster Dimension	93
3.5.2.3	Vergleich von HCD und EThcD bei der Analyse von Phosphoproteomen.....	96
3.5.2.4	Charakteristika bei der massenspektrometrischen Analyse von pLys-Peptiden	97

3.5.2.5	Lysinphosphoimmuniumion während der HCD Fragmentierung	98
3.5.2.6	Phosphoimmunium getriggerte EThcD zur Identifizierung von pLys-Peptiden.....	100
3.5.2.7	Vergleich von Verfahren zur Anreicherung labiler Phosphorylierungen.....	103
3.5.3	Analyse labiler Phosphorylierungen in HEK293-Zellen.....	106
3.6	Tandem-MS von pyrophosphorylierten Peptiden	110
3.6.1	Chromatographisches Verhalten pyro- und diphosphorylierter Peptide	111
3.6.2	HCD-Fragmentierung pyro- und diphosphorylierter Peptide.....	112
3.6.3	CID-Fragmentierung pyro- und diphosphorylierter Peptide	114
3.6.3.1	Faktoren die das Neutralverlustmuster beeinflussen	115
3.6.4	Ionenmobilität pyro- und diphosphorylierter Peptide	121
3.6.5	Zweifelsfreie Lokalisierung von Pyrophosphorylierungsstellen mittels EThcD.....	123
3.6.6	Neutralverlust getriggerte EThcD zur Identifizierung von Pyrophosphopeptiden	126
3.6.7	Identifizierung endogener Proteinpyrophosphorylierungen in <i>S.cerevisiae</i>	131
3.6.8	Neutralverlust getriggerte EThcD- und HCD-Fragmentierung.....	134
3.6.9	Identifizierung endogener Proteinpyrophosphorylierungen in HEK 293-Zellen	139
3.6.10	Identifizierte, endogene Proteinpyrophosphorylierungen	145
4	Zusammenfassung und Ausblick.....	148
5	Material und Methoden.....	152
5.1	Material	152
5.2	Tandemmassenspektrometrie labil phosphorylierter Peptide	152
5.2.1	Synthese labil phosphorylierter Peptide	152
5.2.2	ETD-, HCD- und EThcD-Experimente	153
5.2.3	Datenbankgestützte Analyse der doppelt geladener, labilphosphorylierter Peptide....	154
5.3	Charakterisierung einer endogenen Cysteinphosphorylierung	154
5.3.1	<i>Bottom-up</i> -In-Gelverdauansatz.....	154
5.3.2	<i>Bottom-up</i> -2D-LC-MS-Ansatz mit Lösungsverdau	154
5.3.3	Targeted Tandem-MS-Ansatz	155
5.4	Charakterisierung von Proteinmodifikationen.....	155

5.4.1	Charakterisierung einer pyrophosphorylierten Myoglobinmutante.....	155
5.4.1.1	LC-MS Messung des intakten Proteins	155
5.4.1.2	<i>Bottom-up</i> -Proteomikansatz	156
5.4.2	Charakterisierung einer cysteinphosphorylierten Angiogeninmutante	156
5.4.2.1	LC-MS Messung des intakten Proteins	156
5.4.2.2	<i>Bottom-up</i> -Ansatz.....	157
5.4.3	Charakterisierung von Antikörperwirkstoffkonjugaten und deren Derivaten	157
5.4.3.1	LC-MS-Messung von Antikörper-Wirkstoffkonjugatuntereinheiten	157
5.4.3.2	Dekonvolution der LC-MS-Spektren	158
5.4.3.3	<i>Bottom-up</i> -Proteomikansatz	158
5.4.4	Datenbankgestützte Auswertung synthetisch eingeführter Proteinmodifikationen.....	159
5.4.5	ETD und EThcD <i>top-down</i> -Experimente von Myoglobin	159
5.5	Ansatz zur Identifizierung von pLys auf dem Histon H1	160
5.5.1	Derivatisierung von pLys-Peptiden (Propionylierung)	160
5.5.2	Derivatisierung von Histon H1(Propionylierung)	160
5.5.3	WCX zur Trennung von Proteinen.....	161
5.6	Proteomikansatz zur Analyse labiler Phosphorylierungen	161
5.6.1	Kultivierung und Zelllyse von HeLa-Zellen	161
5.6.2	Phosphopeptidanreicherung mittels SAX.....	162
5.6.3	Phosphopeptidanreicherung mittels TiO ₂	163
5.6.4	Phosphopeptidanreicherung mittels Fe ³⁺ -IMAC	164
5.6.5	Fraktionierung eines HeLa-Proteoms mittels RP-HPLC.....	164
5.6.5.1	Schwach basische RP-HPLC-Bedingungen	164
5.6.5.2	Saure RP-HPLC-Bedingungen	166
5.6.6	LC-MS-Analyse der Fraktionen nach basischer und saurer Fraktionierung	166
5.6.7	Datenbankgestützte Auswertung der Fraktionierung eines HeLa-Proteoms	167
5.6.8	Phosphoimmonium getriggerte EThcD zur Identifizierung von pLys-Peptiden.....	167
5.7	LC-MS-Methode zur Analyse pyrophosphorylierter Peptide.....	169
5.7.1	Synthese pyro- und diphosphorylierter Peptide.....	169
5.7.2	Massenspektrometrische Analyse pyro- und diphosphorylierter Peptide.....	169

5.7.3	Ionenmobilität pyro-und diphosphorylierter Peptide	170
5.7.4	Neutralverlustgetriggerte EThcD-Experimente.....	170
5.8	Identifizierung endogener Proteinpyrophosphorylierungen.....	172
5.8.1	Identifizierung von Proteinpyrophosphorylierungen in <i>S. cerevisiae</i>	172
5.8.1.1	Kultivierung und Zelllyse von Hefezellen.....	172
5.8.1.2	Anreicherung mit Zn-DPA-Komplex	173
5.8.2	Identifizierung endogener Proteinpyrophosphorylierungen in HEK293 Zellen.....	174
5.8.2.1	Kultivierung und Zelllyse von HEK293 Zellen	174
5.8.2.2	Anreicherung mit Zn-DPA-Komplex.....	175
5.8.2.3	Anreicherung von Phosphopeptiden mit IMAC-Beads	176
5.8.2.4	SAX-Fraktionierung angereicherter Peptide	176
5.8.2.5	Neutralverlustgetriggerte EThcD/HCD-Experimente	177
5.8.3	Datenbankgestützte Auswertung zur Identifizierung von Pyrophosphorylierungen...	178
6	Literaturverzeichnis.....	179
7	Anhang	206
	Abkürzungsverzeichnis.....	206
	Abbildungsverzeichnis	211
	Tabellenverzeichnis	215
	Datengrundlage	216
	Anhangsverzeichnis.....	216
	Publikationen, Konferenzbeiträge & Preise	300
	Danksagung.....	302
	Selbstständigkeitserklärung	305

1 Einleitung und aktueller Kenntnisstand

1.1 Die Proteinphosphorylierung - eine posttranslationale Modifikation

Während der Proteinbiosynthese wird die Basensequenz eines mRNA-Moleküls in die Aminosäuresequenz eines Proteins übersetzt. Nach der Translation können Veränderungen an den Proteinen, sogenannte posttranslationale Modifikationen, stattfinden. Eine der bedeutendsten und am meisten untersuchten Modifikationen ist die Proteinphosphorylierung. Sie fand erstmals im Jahre 1906 Erwähnung, als Levene *et al.* eine Phosphorylierung des Proteins Vitellin beschrieben. Weitere 26 Jahre sollte es dauern bis die erste Serinphosphorylierung in die Literatur einging.¹

Es wird davon ausgegangen, dass ca. 30% aller humanen Proteine zu irgendeinem Zeitpunkt eine Phosphorylierung erfahren.² Der Grad der Phosphorylierung wird durch antagonistisch wirkende Proteinkinasen und -phosphatasen reguliert. Kinasen katalysieren unter Verbrauch von ATP die Einführung einer Phosphorylgruppe. Im Gegensatz dazu katalysieren Phosphatasen die Hydrolyse der Proteinmodifikation (vgl. Abbildung 1).³

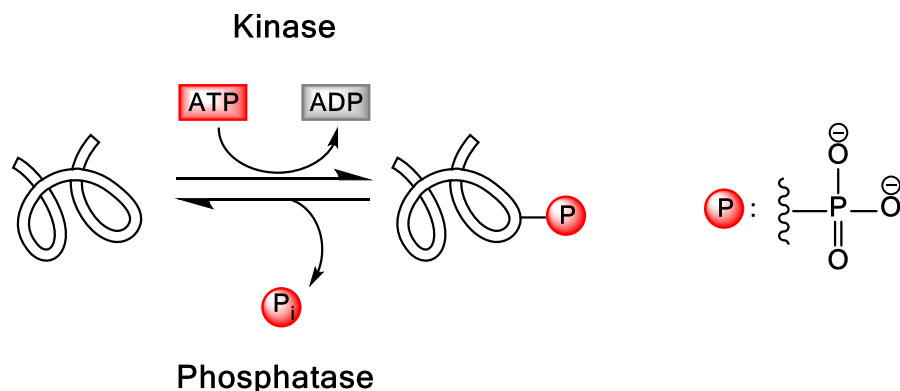


Abbildung 1: Schematische Darstellung der kinase- und phosphataseabhängigen Proteinphosphorylierung.

Unter physiologischen Bedingungen führt der Einbau der Phosphorylgruppe zur Einführung zweier negativer Ladungen, welche eine Konformationsänderung innerhalb des betroffenen Proteinabschnittes nach sich ziehen kann.⁴ Dies ist unter anderem in der Ausbildung von ionischen Wechselwirkungen mit einem oder mehreren benachbarten Argininresten begründet.⁵ Die induzierten Strukturveränderungen ganzer Proteine oder Proteinteile können zu Änderungen der Enzymaktivität, der Lokalisation des Proteins innerhalb der Zelle oder zu Interaktions- und Dissoziationsreaktionen führen, sodass bei nahezu jeder Abschnitt des Zellzyklus reguliert wird.⁶ Ein prominentes Beispiel ist die cAMP-abhängige Proteinkinase A, welche mehr als 100 Proteine an Serin- und Threoninresten phosphoryliert.⁷

Derzeit sind mehr als 500 humane Kinasen bekannt.⁸ Sie stellen damit eine der größten Enzymgruppen innerhalb des humanen Proteoms dar. Neben der immensen Anzahl an Kinasen kodiert das humane Genom für über 150 Phosphatasen, die sowohl Spezifitäten gegenüber Serin, Threonin und Tyrosin als auch duale Spezifität für Serin und Threonin zeigen.⁹ Das wechselseitige Zusammenspiel von Kinasen und Phosphatasen beeinflusst eine Vielzahl physiologischer Prozesse, welche vom Herz-Kreislauf-System über neurologische Mechanismen, die Immunantwort und endokrine Aktivitäten bis hin zum Bewegungsapparat reichen.^{2, 10, 11} Umso schwerwiegender wirken sich Störungen dieses sensiblen Gleichgewichts aus. Durch Mutationen innerhalb des Genoms hervorgerufene Veränderungen von Proteinen können Signalwege beeinflussen und zu ernsthaften Krankheiten führen.² Das wachsende Verständnis dafür, dass Phosphorylierungen in direktem Zusammenhang mit pathologischen Zuständen stehen, hat zu einem gesteigerten Interesse innerhalb der wissenschaftlichen Gemeinschaft geführt, potentielle Phosphorylierungsstellen zu identifizieren und deren Funktionen zu untersuchen. Die daraus gewonnenen Erkenntnisse sind unter anderem in die Entwicklung von Wirkstoffen zur Behandlung von Krebs, chronischen Entzündungen und Diabetes eingeflossen.²

Ein prominentes Beispiel ist der vielfach in der Krebstherapie eingesetzte Wirkstoff Imantinib (vgl. Abbildung 2). Er ist in der Lage, die durch Mutation entstehende BCR-ABL-Tyrosinkinase zu hemmen.¹² Grund für den Gendefekt ist eine reziproke Translokation des Gens der ABL-Tyrosinkinase auf dem Chromosom 9 mit einem Fragment des BCR-Gens des Chromosoms 22. Das in Folge dessen entstehende, sogenannte „Philadelphia-Gen“, führt zur Expression des Fusionsproteins Tyrosinkinase BCR-ABL. Dieses Enzym weist eine im Vergleich zu ABL verstärkte Tyrosinkinaseaktivität auf, sorgt für eine unkontrollierte Bildung von weißen Blutkörperchen und kann der Auslöser für verschiedene Formen von Leukämie sein. In Abhängigkeit der Position des Bruchs im BCR-Gen werden Fusionsproteine unterschiedlicher Größe und Struktur exprimiert, welche zu chronischer myeloischer (CML), akuter lymphatischer (ALL) oder akuter myeloischer Leukämie (AML) führen.^{13, 14} Imantinib hemmt durch selektive, kompetitive Inhibition von ABL-Tyrosinkinasen die krankhaft gesteigerte Vermehrung mutierter Blutstammzellen.

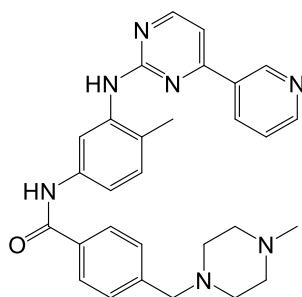


Abbildung 2: Struktur des ABL-Tyrosinkinaseinhibitors Imantinib (Handelsname: Glivec™) zur Behandlung verschiedener Leukämieformen.

1.1.1 Arten von Phosphorylierungen

Lange Zeit fokussierte sich die Forschung auf Phosphorylierungen an den Hydroxylgruppen der Aminosäuren Serin (Ser), Threonin (Thr) und Tyrosin (Tyr) (vgl. Abbildung 3). Der überwiegende Anteil davon (ca. 90%) wird von Serinphosphorylierungen eingenommen. Die restlichen 10% entfallen auf Threonin- und Tyrosinphosphorylierungen. Zusätzlich zu diesen sogenannten *O*-Phosphorylierungen werden Modifikationen der Carboxylgruppen von Asparagin- (Asp) und Glutaminsäure (Glu) gezählt. Diese sind jedoch weitaus seltener und wurden bis dato nur in Proteomen von Bakterien und Pilzen zweifelsfrei nachgewiesen.¹⁵⁻¹⁷

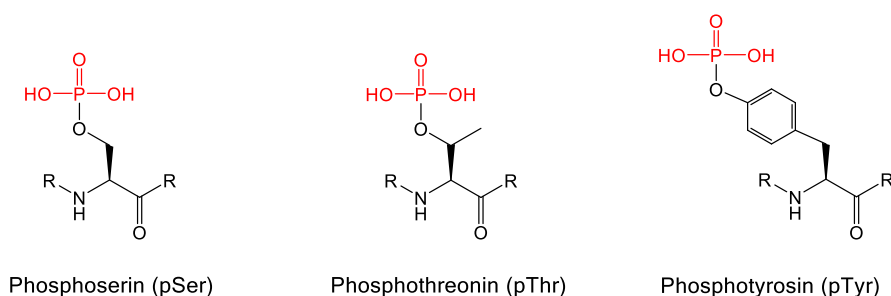
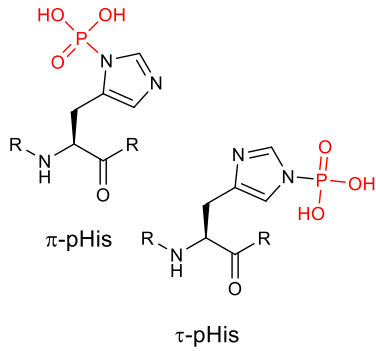


Abbildung 3: Struktur der *O*-Phosphorylierungen von Serin, Threonin und Tyrosin.

Jüngste Studien belegen, dass Phosphorylierungen auch an anderen Aminosäuren auftreten und eine biologische Relevanz aufweisen können.^{18, 19} Zu diesen zählen Phosphorylierungen der nukleophilen Seitenketten der stickstoffhaltenden Funktionalitäten von Arginin (Arg), Histidin (His) und Lysin (Lys), welche unter dem Begriff *N*-Phosphorylierungen zusammengefasst werden können.^{20, 21} Außerdem sind Modifikationen der Thiolgruppe des Cysteins (*S*-Phosphorylierungen) und zusätzliche Phosphorylierungen bereits bestehender Serin- und Threoninphosphorylierungen zu Pyrophosphorylierungen dokumentiert (vgl. Abbildung 4).^{22, 23}

Trotz zahlreicher Fortschritte auf dem Gebiet der Protein- und Peptidanalytik finden diese Modifikationen bislang deutlich seltener Erwähnung in der Literatur. Einer der möglichen Gründe besteht in der inhärenten Labilität dieser Modifikationen gegenüber den niedrigen pH-Werten, wie sie in verschiedenen phosphoproteomischen Techniken Anwendung finden.

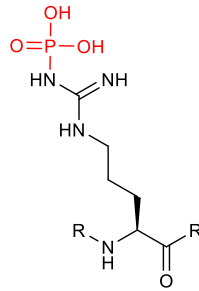
Unter den labilen Phosphorylierungen ist die Histidinphosphorylierung (pHis) die am meisten untersuchte Modifikation. Erstmals im Jahre 1962 erwähnt, weiß man heute, dass sie in Bakterien, Pflanzen, Säugetierzellen und Pilzen auftreten kann.^{19, 24, 25} Aktuelle Studien zeigen, dass deren Anteil am gesamten Proteom von Bakterien erheblich höher ist, als lange Zeit angenommen und ein Paradigmenwechsel bei der Betrachtung von Phosphoproteomen angezeigt ist.²⁶



Phosphohistidin (pHis)

Zwei-komponenten Signal-
übertragung in Prokaryoten ²⁷

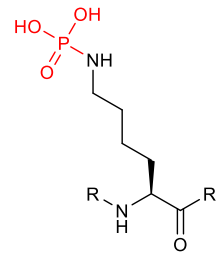
Histone H4 in Säugerleberzellen ³⁰



Phosphoarginin (pArg)

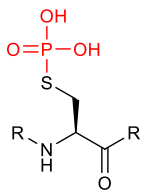
Histon H3 in Maus
Leukemiazellen ²⁸

CtsR-Inhibition in *B. subtilis* ²¹



Phospholysin (pLys)

Histone H1 in Rattenleber- und
Walker-256 Karzinomzellen ²⁹

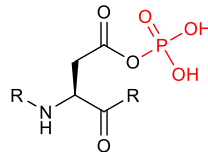


Phosphocystein (pCys)

Phosphoenolpyruvate-abhängige
Phosphotransferase in *E. coli* ³¹

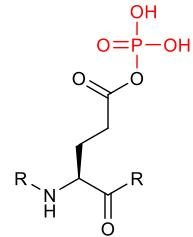
Aktive Position von PTB1B ³³

SarA/MgrA Familie in *S. aureus* ²²

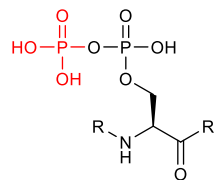


Phosphoaspartat (pAsp)

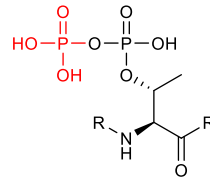
Prothymosin α in Säugern ³²



Phosphoglutamat (pGlu)



Pyrophosphoserin (ppSer)



Pyrophosphothreonin (ppThr)

Verschiedene Proteine in *S. cerevisiae* ²³

Abbildung 4: Struktur labiler Phosphorylierungen und deren Nachweis *in vitro* (blau) oder *in vivo* (grün).³⁴

Die außerordentliche biologische Relevanz der Histidinphosphorylierung wird durch eine kürzlich erschienene Arbeit von Hindupur *et al.* unterstrichen.¹⁹ In dieser wird die Rolle der Modifikation in der Karzinogenese von Lebertumoren beschrieben.

Ähnlich wie bei pHis konzentrierte sich die Erforschung von Argininphosphorylierungen (pArg) bislang primär auf Bakterienproteome.^{20, 35, 36} Eine besonders herausragende Arbeit gelang der Gruppe um Tim Clausen. Sie demonstrierte, dass die Kinase McsB Argininreste in der DNA-Bindungsdomäne des Heat-shock Regulatorproteins CtsR phosphoryliert, somit inhibitorisch in die Regulation der Transkription eingreift.²¹ Außerdem konnte gezeigt werden, dass pArg markierte Proteine von der Clp Protease erkannt und abgebaut werden, sodass der Argininphosphorylierung eine entscheidende Rolle beim Proteinumsatz zukommt.¹⁸

Weniger ist über die dritte N-phosphorylierung Phospholysin (pLys) bekannt. Trotz ihrer ersten Erwähnung im Jahre 1967 und weiterer Studien, welche die Existenz dieser Modifikation in Säugerzellen beschreiben, ist bislang wenig über die biologische Bedeutung von pLys dokumentiert.^{20, 37} Arbeiten aus den 70er Jahren legen nahe, dass pLys auf dem Histone H1 von regenerierten Rattenleberzellen und Walker-256 Krebszellen vorkommt.²⁹ Darüber hinaus wurde eine Pyrophosphatphosphatase als eine mögliche pLys-Phosphatase identifiziert.³⁸ Im Gegensatz zu pHis und pArg gelang jedoch bislang kein eindeutiger (molekularer) Nachweis einer Lysinphosphorylierung in einem Protein. Eine spezifische Kinase, welche in der Lage wäre Lysinreste zu modifizieren, ist bis dato ebenfalls nicht bekannt. Aufgrund ähnlicher chemischer Eigenschaften wie pHis oder pArg wird jedoch stets über eine mögliche, biologische Bedeutung der Lysinphosphorylierung spekuliert.

Phosphocystein (pCys) ist vor allen Dingen als wichtige Aminosäure im aktiven Zentrum verschiedener Cystein-abhängiger Phosphatasen (CDPs), wie z.B. PTB1B und Phosphatasen aus Rattenleberzellen, bekannt.^{39, 40} Ferner tritt es als Intermediat im phosphoenolpyruvatabhängigen Phosphotransfersystem auf. Nicht zuletzt wurde pCys auf den Transkriptionsregulatoren SarA/MgrA von *Staphylococcus aureus* nachgewiesen, wo es sich für die Resistenz der Pathogene gegenüber Antibiotika verantwortlich zeigt.²²

Eine weitere labile Modifikation stellt die Proteinpyrophosphorylierung dar. Umrahmt von sauren Aminosäureresten tritt diese nicht enzymatisch eingeführte Modifikation an zuvor phosphorylierten Serin- und Threoninresten auf.^{23, 41, 42} Es wird angenommen, dass die Übertragung des weiteren Phosphatrestes mit Hilfe von Inositolpyrophosphatmessengern in Gegenwart von Magnesiumionen erfolgt. Obwohl verschiedene Prozesse, darunter Insulinausschüttung, Ribosomenbiogenese, Blutgerinnung und Krebszellmigration in Verbindung mit diesen Messengermolekülen gebracht werden, gelang es bislang nicht zu klären, inwieweit Proteinpyrophosphorylierungen hierbei eine Rolle spielen.⁴³⁻⁴⁸ Bisherige Studien basierten ausschließlich auf *in vitro* Markierungsstrategien und führten zur Identifikation einer Handvoll möglicher Substrate in Hefe- und Säugerzellen.^{23, 49, 50} Die kontrovers diskutierte Frage, ob die Proteinpyrophosphorylierung überhaupt *in vivo* existiert, blieb somit unbeantwortet.⁵¹

1.1.2 Labilität von Phosphorylierungen

Das Adjektiv labil leitet sich von dem spätlateinischen *labilis* (leicht gleitend) ab. Der Duden grenzt die Bedeutung als „nicht fest gefügt, sondern zur Veränderung, zu Schwankungen neigend, unbeständig, leicht störrisch“ ein. Synonym für das Wort labil werden unter anderem anfällig, empfindlich, fragil, instabil oder störanfällig verwendet. Antonym für die Labilität wird die Stabilität gebraucht.⁵²

Im Kontext der Phosphorylierungen werden unter dem Begriff Labilität verschiedene Aspekte zusammengefasst: Hierbei sei zu allererst die geringere chemische Stabilität der nukleophilen Phosphoramidate pHis, pArg und pLys, sowie des Phosphorthioats pCys und der gemischten Anhydride pAsp und pGlu im Vergleich zu Phosphorylierungen von Serin, Threonin oder Tyrosin, gegenüber sauren und teilweise basischen Bedingungen zu nennen. Des Weiteren verfügen labile Phosphorylierungen über eine geringe thermische Stabilität und können labil gegenüber massenspektrometrischen Ionisierungs- und Fragmentierungstechniken sein (vgl. Kapitel 1.2.5.2).

Die chemische Labilität von Phosphoramidaten lässt sich aus der Gibbs-Energie (freien Enthalpie, ΔG) ableiten. Im Vergleich zu Phosphomooestern ($\Delta G^\circ = -6.5$ bis -9.5 kcal/mol)^{53, 54} liegt diese für pArg, pHis und pLys zwischen -10.3 und -14 kcal/mol⁵⁵⁻⁵⁷, sodass eine Hydrolyse des Phosphatrestes thermodynamisch bevorzugt ist. Obwohl der ϵ -Stickstoff von Phospholysin unter einem physiologischen pH-Wert sehr wahrscheinlich als protoniert vorliegt (pK_a von *N*-butylphosphoamid $\approx 9,9$),⁵⁸ so dass die P-N-Bindung geschwächt wird, weisen die Phosphoramidatstickstoffe von pHis und pArg keine basischen Eigenschaften auf.³⁴ Das freie Elektronenpaar von pHis ist Bestandteil des aromatischen Systems und das des Phosphorarginins liegt partiell delokalisiert in einem sechsgliedrigen Ring vor (vgl. Abbildung 5).^{20, 59}

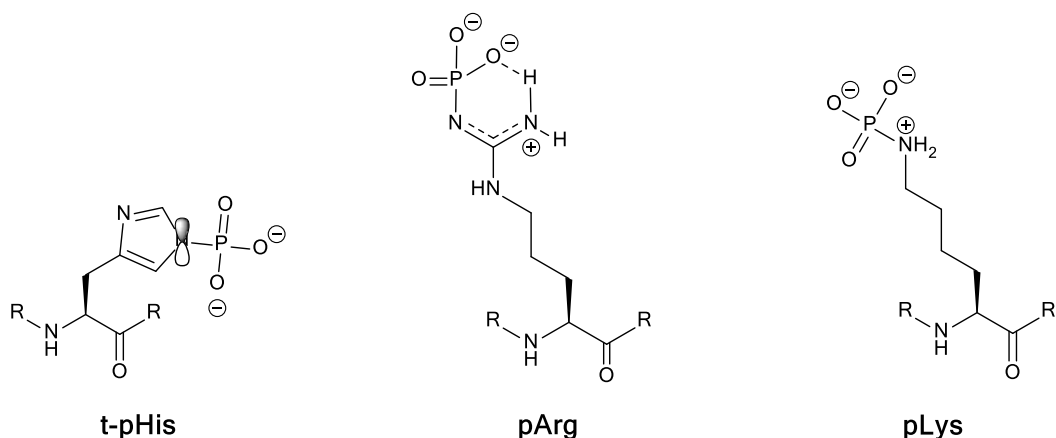


Abbildung 5: Angenommene Strukturen und Ladungsverteilungen von pHis, pArg und pLys unter einem physiologischem pH-Wert.^{20, 34, 58, 59}

Erschöpfende Studien zur Stabilität von *N*-Alkylphosphoramidatestern zeigten, dass es unter stark sauren (1 M HCl, pH=0) und stark basischen (1M NaOH, pH=14) Bedingungen zu einer rapiden Abnahme der phosphorylierten Spezies innerhalb weniger Stunden kommt. Wurden die Phosphoramidate jedoch mit niedriger konzentrierten Säuren (0,1% TFA, pH=2) oder Puffersystemen mit pH-Werten zwischen 4,7 (0,1 M NH₄OAc) und 9,7 (0,1 M NH₄OAc) inkubiert, betrug die Hydrolyse innerhalb von fünf Stunden weniger als 20%.⁶⁰

Der Phosphorylierungsgrad von Phosphorthiolaten nimmt bei pH-Werten von 2,9 (0,1% FA) und 2,0 (0,1% TFA) sowie Raumtemperatur innerhalb von drei Stunden in etwa um die Hälfte ab. Unter schwach sauren Bedingungen (0,1 M NH₄OAc, pH 4,7) ist die Labilität höher als bei den Phosphoramidaten. Dennoch ließen sich nach fünf Stunden Inkubationszeit ca. zwei Drittel des ursprünglich eingesetzten pCys-Peptides nachweisen. Die geringste Hydrolyse der Cysteinphosphorylierung wurde in einem pH-Wertbereich zwischen 7,4 und 8,4 (0,1 M Tris) verzeichnet.⁶¹

Beide Studien dokumentierten die inhärente Labilität von Phosphoramidaten- und thiolaten gegenüber sauren Bedingungen. Sie zeigten jedoch auch, dass ein kurzzeitiger Einsatz saurer Lösungen (pH>2) im analytischen Verfahren Hydrolysen in geringem Umfang verursachen, sodass eine zuverlässige Charakterisierung der intakten Moleküle möglich sein sollte.

Pyrophosphorylierte Peptide wiesen im Vergleich zu Phosphoramidaten- und thiolaten eine geringere Labilität gegenüber niedrigen pH-Werten auf. Äußerst harsche Bedingungen (0,1 M HCl, pH=1,0) waren erforderlich, um über einen Zeitraum von 24 h bei Raumtemperatur eine Hydrolyse von 24% zu bewirken. Erhöhte man die Temperatur auf 37°C so nahm die Hydrolyse im gleichen Zeitraum auf 67% zu. Verschiebungen des pH-Wertes in den basischen Bereich (0,1 M NaOH, pH=13,1) zogen eine vollständige Hydrolyse bei Raumtemperatur nach sich. Außerdem bewirkten sulfonsäureenthaltende Puffer, wie HEPES oder MES, trotz ihres neutralen pH-Wertes eine signifikante Hydrolyse der Modifikation. Allgemein sind Pyrophosphorylierungen jedoch inert gegenüber chemischer Hydrolyse über einen weiten pH-Wertbereich und diverse Puffersysteme. Sie werden daher auch als semilabil eingestuft.⁶²

Sowohl für Studien zur Stabilität als auch für die Entwicklung analytischer (massenspektrometrischer) Verfahren sind synthetische, positionsspezifisch modifizierte Peptide als Modellsystem von entscheidender Bedeutung, weshalb im folgenden Abschnitt die Fortschritte zur Darstellung dieser Peptide näher beleuchtet werden.

1.1.3 Synthesestrategien zur Darstellung labiler Peptidphosphorylierungen

Für die Entwicklung leistungsfähiger massenspektrometrischer Verfahren zur Analyse labiler Peptidmodifikationen ist es von eminentem Vorteil, wenn man einen Zugang zu dem eigentlichen Analyten in Form von Standardverbindungen hat. Diese ermöglichen es, neben der Labilität, diverse weitere Eigenschaften wie das Fragmentierungsverhalten, die Ionisierungsfähigkeit oder das chromatographische Verhalten zu untersuchen. Daher wurden verschiedene chemoselektive Reaktionen, welche die gezielte Implementierung einer Phosphorylierung innerhalb eines Peptides ermöglichen, entwickelt. Die große Herausforderung besteht darin, nach der Festphasenpeptidsynthese (*solid phase peptide synthesis*, SPPS) die ungeschützte Aminosäuresequenz selektiv unter Verzicht harscher Abspaltungs- und Entschützungsbedingungen zu modifizieren (vgl. Abbildung 6).³⁴

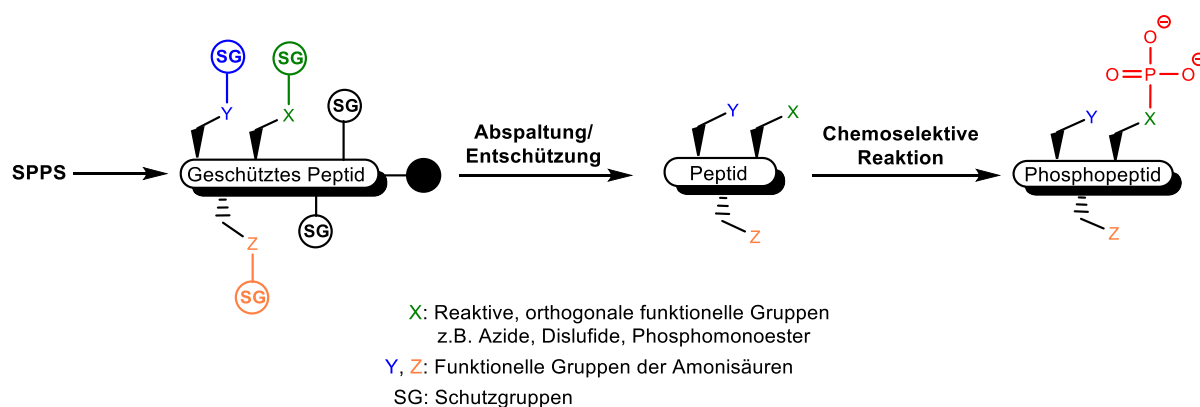


Abbildung 6: Allgemeines Schema zur Darstellung labiler Peptidphosphorylierungen.³⁴

Für die Synthese von Phosphohistidinpeptiden wird die ungeschützte Aminosäuresequenz mit Phosphorylchlorid bei einem pH-Wert $> 9,5$ umgesetzt.⁶³ Erhöht man den pH-Wert, so lassen sich auch Lysin- und in Kombination mit Cu(II)-Salzen Argininreste phosphorylieren.^{37, 64} Darüber hinaus werden Phosphoramidatsalze verwendet, um aminosäurespezifisch die Phosphorylierung einzuführen. So reagiert beispielsweise Kaliumphosphoramidat, welches durch den Austausch von Ammoniak mit einem Ammoniumphosphoramidat erhalten wird, mit ca. 15% Umsatz selektiv mit Histidinresten. Im Reaktionsgemisch finden sich sowohl die einfach phosphorylierten π -pHis und τ -pHis (siehe Abbildung 4) als auch die doppelt phosphorylierte Spezies (1,3-di-pHis) wieder. Das Verhältnis der einzelnen Produkte zueinander wird über die Reaktionszeit kontrolliert.^{63, 65} Enthält die Peptidsequenz zusätzlich noch Lysinreste, muss bei einem unvollständigen Ammoniak austausch jedoch mit Nebenreaktionen gerechnet werden.⁶⁶ Ein zusätzlicher Nachteil dieser Ansätze besteht darin, dass bei der Anwesenheit weiterer Histidinreste eine selektive Phosphorylierung eines dieser Reste nicht möglich ist.

Neben der bereits aufgeführten Synthese mit einem P(V)-Reagens lassen sich pArg-Peptide enzymatisch mit Hilfe der Proteinargininkinase McsB und ATP synthetisieren.⁶⁷ Darüber hinaus wurde für die positionsspezifische Einführung einer Argininphosphorylierung ein Fmoc-geschützter SPPS-Phosphoargininbaustein (Fmoc-Arg(PO(OTc)₂)-OH) synthetisiert. Dieser Baustein ist mit säure- und basenstabilen 2,2,2-Trichlorethylschutzgruppen ausgestattet und ermöglicht somit die Freisetzung geschützter Aminosäurereste und die Mobilisierung des modifizierten Peptides ohne Verlust der Phosphorylierung. Nach der Abspaltung von der Festphase wird das pArg-Peptid final durch eine Hydrierung unter basischen Bedingungen erhalten (vgl. Abbildung 7).⁶⁸

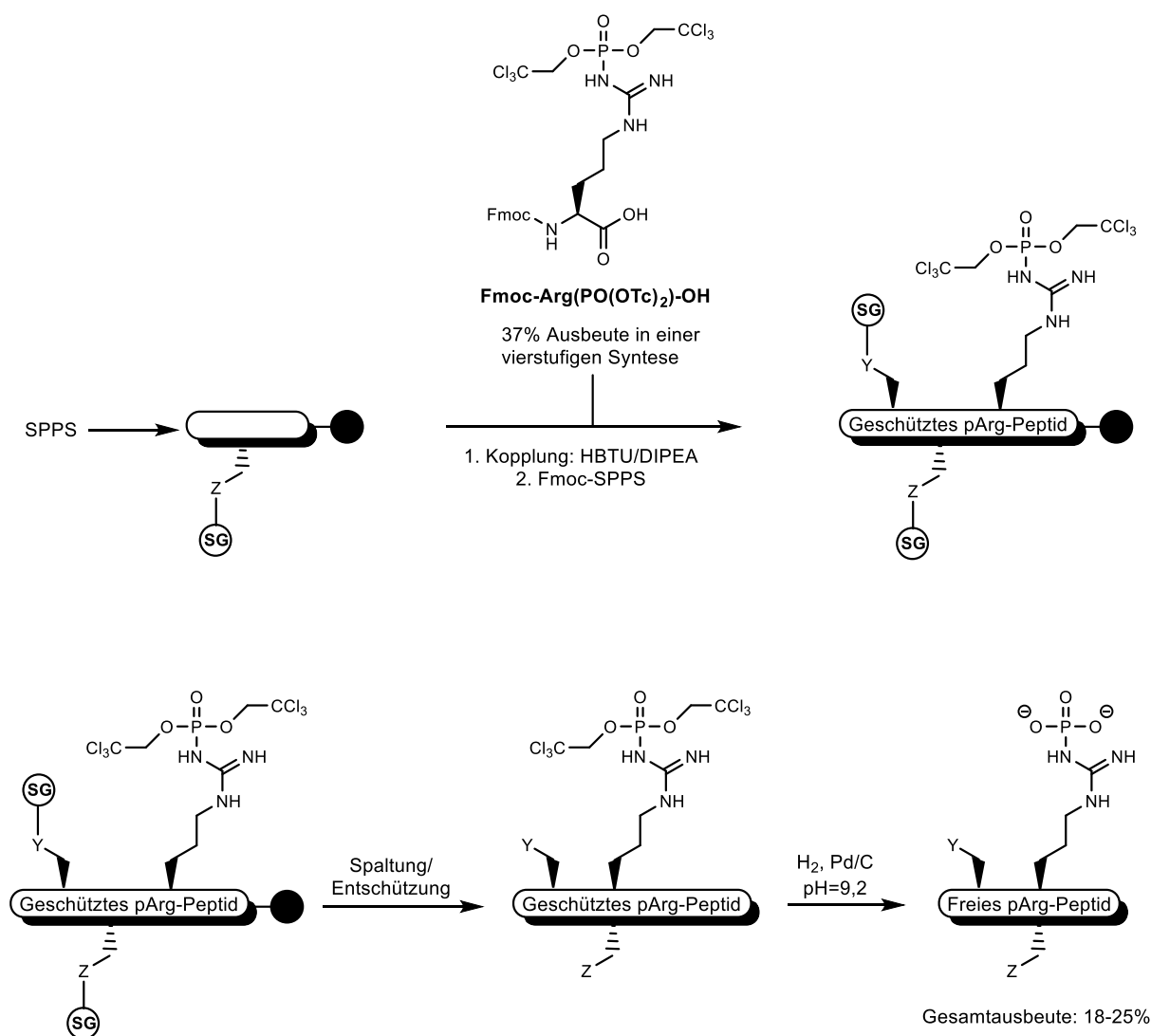


Abbildung 7: Synthesestrategie zur positionsspezifischen Einführung von pArg.^{34, 68}

Wie zuvor erwähnt, hat man mittels Phosphorylchlorid nur einen unselektiven Zugang zu pLys-Peptiden. Die Entwicklung der chemoselektiven Staudinger-Phosphitreaktion und deren Anwendung auf azido-Lysinpeptide überwand diese Limitierung und ermöglichte die regioselektive Einführung von Lysinphosphorylierungen auf Peptidebene.⁶⁰ Die in der Gruppe von Christian Hackenberger entwickelte Syntheseroute erlaubt die Darstellung von pLys-Peptiden unter Anwesenheit weiterer Lysinreste, eine Fähigkeit, welche essentiell für wichtige Erkenntnisse auf dem Gebiet der Tandemmassenspektrometrie war.^{60, 69} Unter Verwendung verschiedensubstituierter Phosphite wurden zwei Synthesestrategien verfolgt: Zum einen wurde eine Synthese in Lösung unter Erhalt eines geschützten pLys-Peptides entwickelt, bei der das pLys-Peptid durch Bestrahlung freigesetzt wird (vgl. Abbildung 8a).⁶⁰ Zum anderen wurde ein basenlabiles Harz und ein cyanoethylgeschütztes Phosphoramidat genutzt, um durch basische Spaltung pLys-Peptide zu erhalten (vgl. Abbildung 8b).⁷⁰

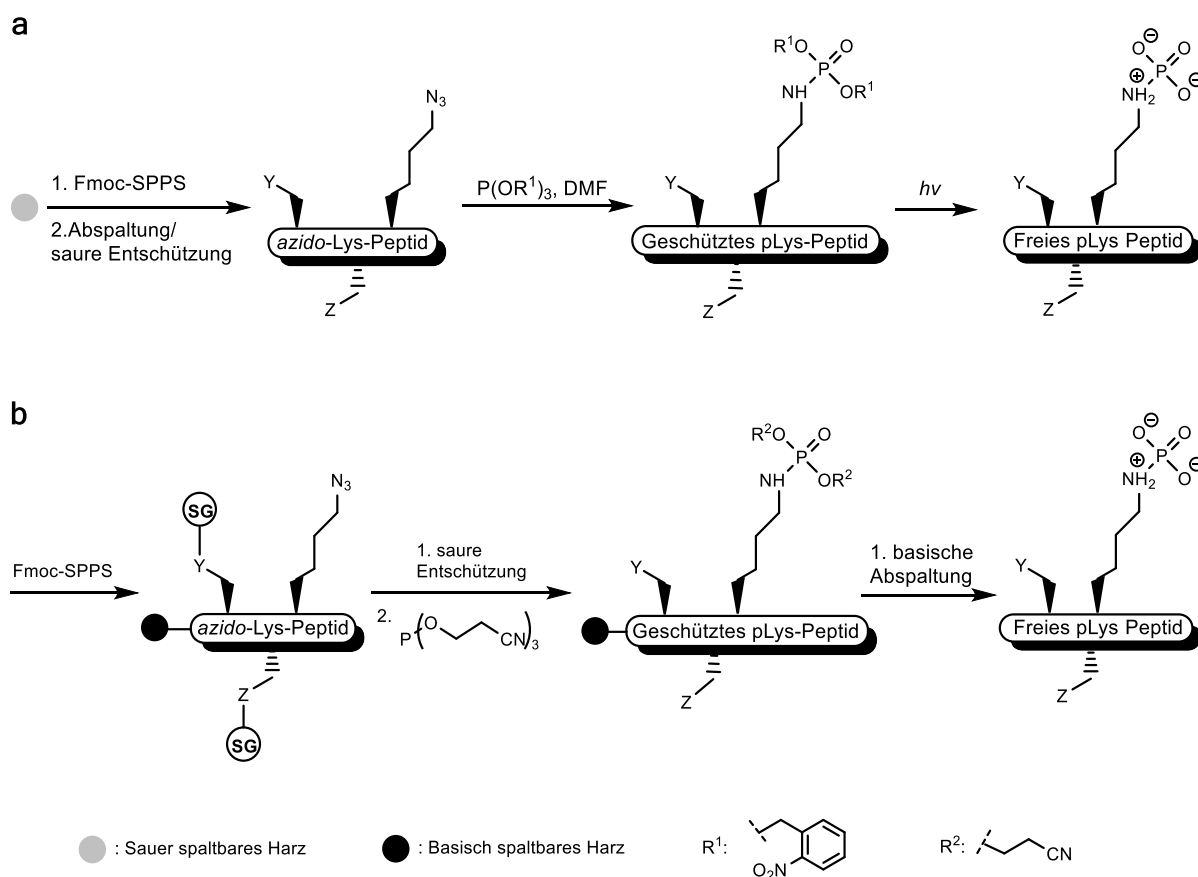


Abbildung 8: Chemoselektive Synthesen von pLys-Peptiden.³⁴

Die Synthese kann in Lösung (**a**) oder ausgehend von einem festen Trägermaterial (**b**) erfolgen.^{60, 70}

In der Gruppe von Benjamin Davis wurde eine Variante zur Darstellung von Cysteinphosphorylierungen in Proteinen und Peptiden entwickelt.^{71, 72} Sie basiert auf einem zweistufigen Syntheseprotokoll, bei dem im ersten Schritt der Cysteinrest unter Bildung eines Dehydroalanins eliminiert wird. Im zweiten Schritt erfolgt die Cysteinphosphorylierung durch Reaktion mit einem Thiophosphat (vgl. Abbildung 9A).⁷¹

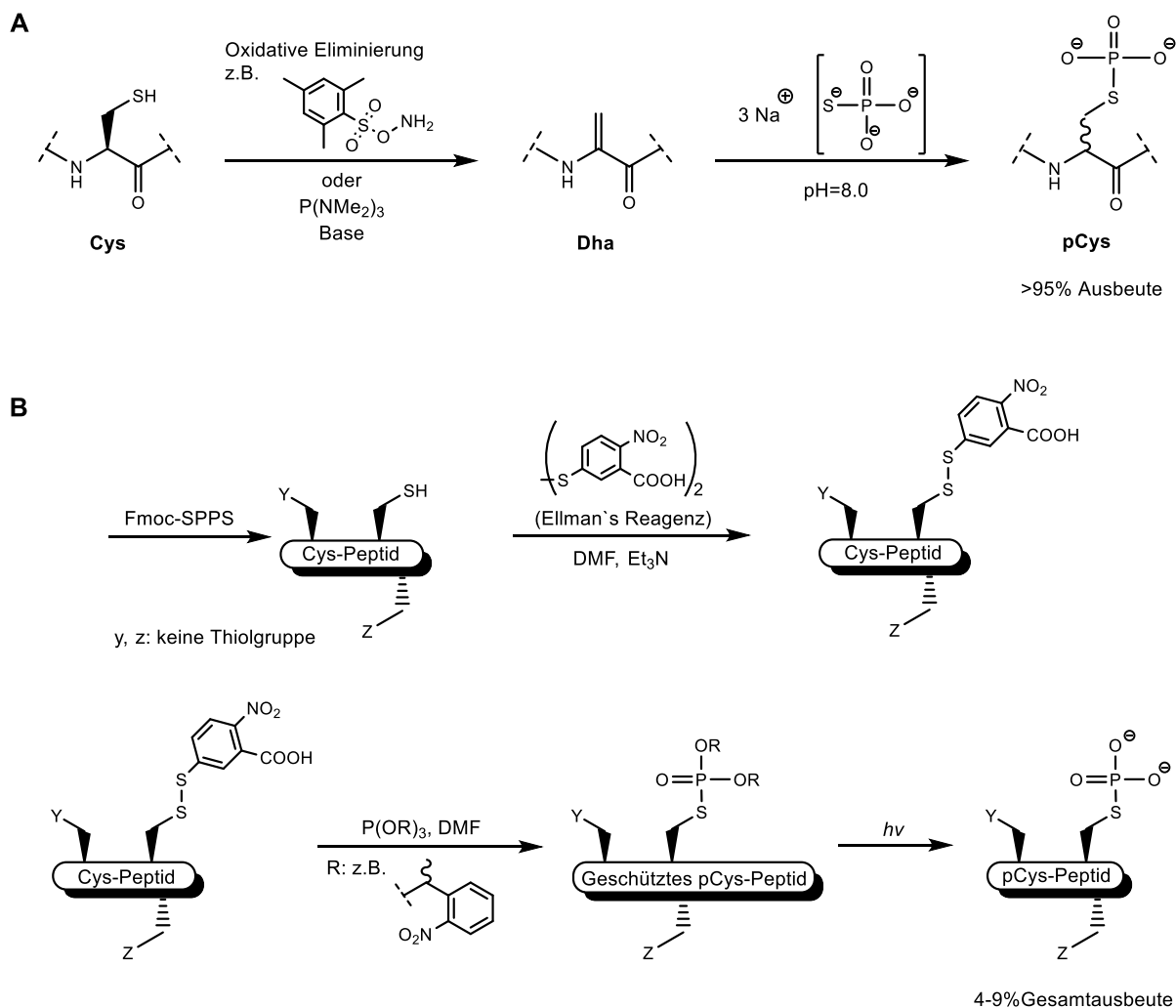


Abbildung 9: Chemoselektive Synthese von Cysteinphosphorylierungen.³⁴

Variante **A** basiert auf einem zweistufigen Ansatz bei dem ein Enantiomergemisch synthetisiert wird.⁷² Variante **B** ermöglicht die Synthese enantiomerenreiner pCys-Peptide unter Erhalt der Stereochemie.⁶¹

Die Reaktion liefert unabhängig von der Größe des reagierenden Nucleophils sowohl die *D*- als auch die *L*-Form in einem Verhältnis von 60:40.⁷³ Dieser Aspekt wurde von Bertran *et. al.* aufgegriffen. Sie entwickelten einen Synthesansatz, welcher enantiomerenreine pCys-Peptide unter Erhalt der Stereochemie erlaubt. Dazu wird die Thiolgruppe des Cysteins mit Ellman's Reagenz unter Erhalt eines elektrophilen Disulfides umgesetzt. Der somit aktivierte Cysteinrest wird anschließend selektiv mit verschiedenen nukleophilen Phosphiten, unter Bildung der entsprechenden Phosphorthioate, umge-

setzt. Das enantiomerenreine pCys-Peptid in seiner endogenen *L*-Form wird im letzten Schritt durch Bestrahlung gewonnen (vgl. Abbildung 9B).⁶¹ Die Retention der Stereochemie wurde anhand von ³¹P- und ¹H NMR-Messungen sowie chromatographischen Untersuchungen verifiziert. Trotz der bemerkenswerten Fortschritte auf dem Feld der chemoselektiven Synthese von Cysteinphosphorylierungen ist eine positionsspezifische Einführung der Modifikation derzeit mit Hilfe beider Ansätze nicht möglich. Die gezielte Phosphorylierung eines Cysteinrestes innerhalb eines Proteins, welches weitere Cysteinresten beinhaltet, stellt daher eine große Herausforderung in der Zukunft dar.

Um ein tieferes Verständnis der biologischen Funktion von Proteinyrophosphorylierungen zu erlangen, wurde in der Gruppe von Dorothea Fiedler eine Methode zur positionsspezifischen Einführung dieser Modifikation auf Peptidebene entwickelt. Das Verfahren nutzt die immanente Nukleophilie von Serin- und Threoninresten, um unter Einwirkung eines Phosphorimidazolidreagenzes eine Pyrophosphatbindung zu generieren (vgl. Abbildung 10).^{74, 75} Um mögliche Interaktionspartner pyrophosphorylierter Proteine zu identifizieren, gilt es als nächstes einen Weg zu finden, die Pyrophosphorylierung auf Proteinebene einzuführen.

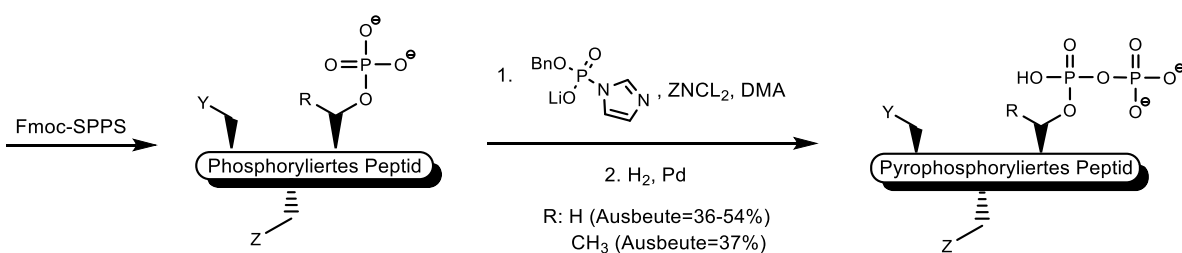


Abbildung 10: Chemoselektive Synthese von pyrophosphorylierten Peptiden.^{34, 74, 75}

Nachdem die wichtigsten Synthesestrategien zur Darstellung labiler Phosphorylierungen aufgeführt und deren Bedeutung herausgestellt wurde, gilt es im nächsten Schritt näher darauf einzugehen, wie sich diese Modifikationen auf Protein- und Peptidebene in biologischen Systemen nachweisen lassen. Vor diesem Hintergrund wurden verschiedene Ansätze entwickelt, auf deren Funktion, Relevanz und Ablauf im Folgenden näher eingegangen werden soll.

1.2 Analyse von Protein- und Peptidmodifikationen

1.2.1 *Bottom-up* und *Top-down*-Proteomik

Die Untersuchung von Proteinen und deren Modifikationen mittels massenspektrometrischer Methoden kann in ihrer intakten Form (*top-down*) oder durch partielle Hydrolyse zu relativ großen Peptiden (*middle-down*) erfolgen. Diese Ansätze bieten den Vorteil, dass alle oder ein Großteil der Modifikationen gleichzeitig erfasst werden. Außerdem lassen sich Spleißvarianten und Verkürzungen der Aminosäuresequenz erfassen und die biologische Funktion kompletter Proteoformen untersuchen.⁷⁶⁻⁸²

Diese Informationen gehen größtenteils während des sogenannten *bottom-up*-Ansatzes, bei dem die Proteine zu Peptiden hydrolysiert werden, verloren. Dennoch erfährt diese Strategie eine weitaus größere Beliebtheit. Die *bottom-up*-Techniken werden in verschiedene Varianten unterteilt, wobei jede ein besonderes Aufgabengebiet und ein bestimmtes Leistungsprofil abdeckt. Für alle Techniken gleichsam gilt, dass zu Beginn die Proteine aus einer Zellkultur oder einem Gewebe extrahiert und im Anschluss mit einer sequenzspezifischen Protease, wie z.B. Trypsin, zu Peptiden verdaut werden. Das entstandene Peptidgemisch kann danach fraktioniert oder in Bezug auf bestimmte Proteinmodifikationen angereichert werden. Im nächsten Schritt werden die Peptide mittels nanoLC-Reversed-Phase Chromatographie (nanoRP-HPLC) getrennt und über Elektrosprayionisation (*electrospray ionisation*, ESI) ionisiert. Die entstandenen Peptid-Precursorionen werden im Anschluss in das Vakuum des Massenspektrometers transferiert und in der Gasphase durch verschiedene Techniken in Bruchstücke (Fragmente) gespalten. Die Fragmentierung von Precursorionen wird unter dem Begriff Tandemmassenspektrometrie zusammengefasst. Auf diesem Weg generierte Fragmentspektren ermöglichen die Identifizierung von Peptiden und deren von Modifikationen. Die während eines *bottom-up*-Ansatzes anfallenden, beträchtlichen Datenmengen werden mit Hilfe bioinformatischer Methoden und unter systembiologischen Gesichtspunkten analysiert und ausgewertet (vgl. Abbildung 11).⁸³⁻⁸⁶

Prinzipiell werden drei *bottom-up*-Ansätze unterschieden: Der sogenannte *shotgun* Proteomik Ansatz nutzt die datenabhängige Akquisition von MS/MS-Spektren (DDA) und zielt darauf ab, einen Großteil des Proteoms zu erfassen. *Targeted* Proteomik (gezielte Proteomik) beschränkt sich auf die reproduzierbare und empfindliche Erfassung einzelner, bekannter Peptide mittels *single reaction monitoring* (SRM) oder *multi reaction monitoring* (MRM). Bei der datenunabhängigen Aufzeichnung (DIA) erfolgt eine simultane Fragmentierung verschiedener Peptide innerhalb eines bestimmten m/z -Bereiches, welche zu umfangreichen und komplexen Fragmentationenkarten führt.

In einem DDA-Experiment werden alle Ionenspezies, welche zu einem bestimmten Zeitpunkt in den Massenspektrometer gelangen, in einem hochaufgelösten Übersichtsspektrum (auch MS^1 , Full-Scan oder Precursorion-Scan genannt) erfasst, sodass deren Ladungszustand und m/z -Verhältnis bekannt sind.

Workflow eines Bottom-up Phosphoproteomikansatzes

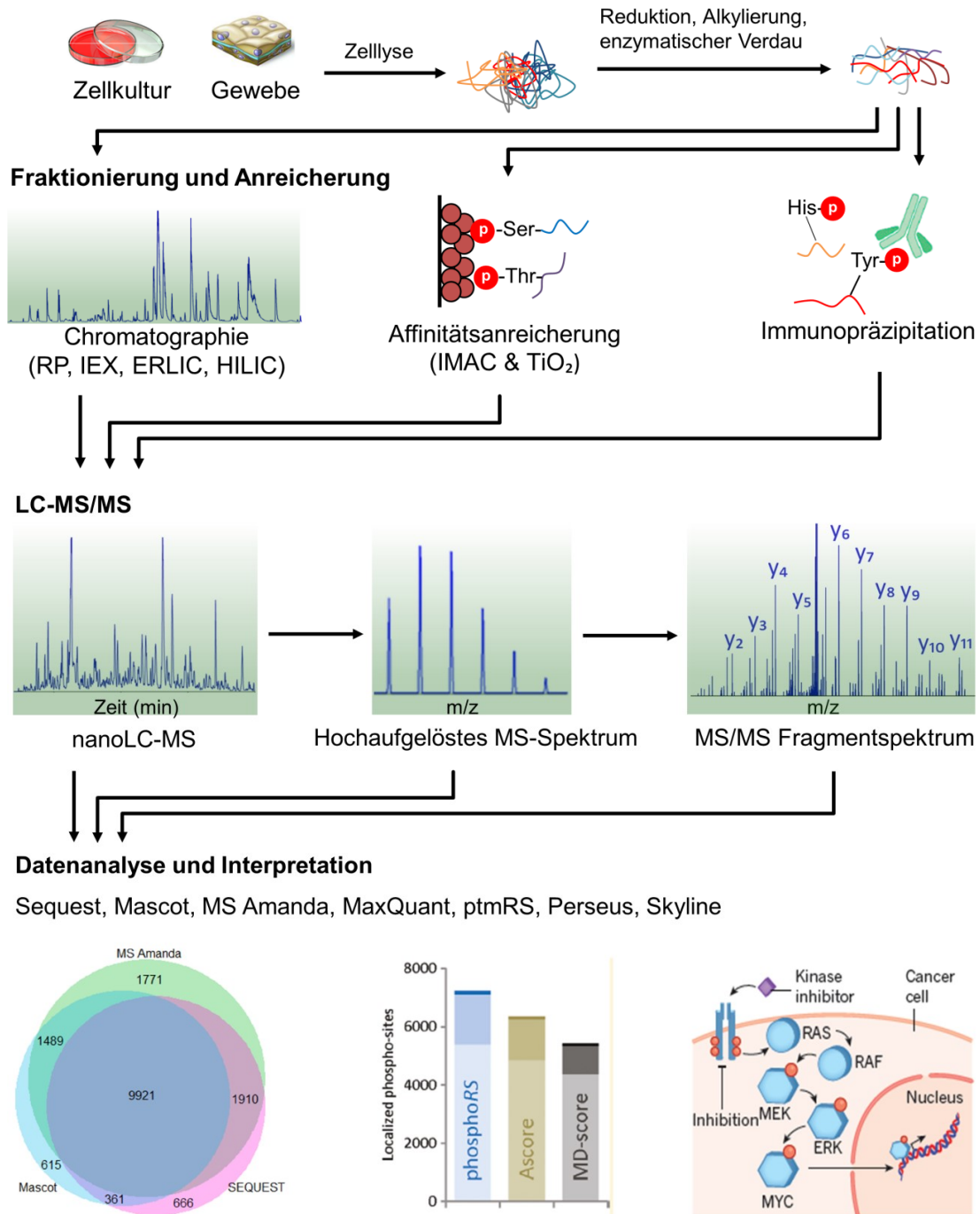


Abbildung 11: Schema des Ablaufes eines *bottom-up*-Phosphoproteomikansatzes^{83, 85-91}

Nach der Isolierung von Proteinen, werden diese reduziert, alkyliert und enzymatisch verdaut. Im nächsten Schritt werden Phosphopeptide mit Hilfe von Anreicherungs- und Fraktionierungstechniken von unphosphorylierten Peptiden weitgehend abgetrennt. Die gewonnenen Peptide werden danach mittels nanoLC-MS getrennt, ionisiert und massenspektrometrisch in einer datenabhängigen Aufzeichnung, bestehend aus einem hochauflösten Übersichtsspektrum und diversen Fragmentspektren, erfasst. Die erzeugten Fragmentspektren werden abschließend mit Hilfe verschiedener bioinformatischer Werkzeuge interpretiert und ausgewertet.

Im Anschluss daran werden so viel wie möglich dieser erkannten Precursorionen sequentiell isoliert und fragmentiert (MS^2 -Level). Der Zyklus des alternierenden Wechsels aus der Aufzeichnung eines Übersichtsspektrums und mehrerer Fragmentspektren wird in der Regel zeitlich begrenzt und stetig wiederholt. In einem typischen „top N Zyklus“, wobei N die Anzahl der MS^2 -Spektren angibt, folgen jedem MS^1 beispielsweise 10 MS/MS -Scans, wobei die Precursorion nach unterschiedlichen Kriterien, wie der Intensität, dem Ladungszustand oder dem m/z -Verhältnis nacheinander fragmentiert werden. Um wiederholtes Fragmentieren hochabundanter Precursorionen zu vermeiden und an analytischer Tiefe zu gewinnen, werden bereits fragmentierte Precursorionen für ein definiertes Intervall (meist 40-60 sec) von weiteren Fragmentierungen ausgeschlossen (dynamische Ausschlusszeit). In modernen Hybrid- und Tribrid-Orbitrapmassenspektrometern erfolgt aus Gründen der Schnelligkeit und Empfindlichkeit die Erfassung von Fragmentspektren in einer Ionenfalle parallel zur Aufzeichnung des Übersichtsspektrums in der Orbitrapzelle. Durch die sukzessiv verbesserte Auflösung der Orbitrapmassenspektrometer und der damit einhergehenden Verkürzung der Messzeit bei gleicher Auflösung, ist gegenwertig die Messung von bis zu 40 hochaufgelösten MS/MS pro Sekunde und die Identifizierung von ca. 5000 Phosphopeptiden innerhalb von 15 min möglich.⁹² Die Orbitraptechnologie beinhaltet jedoch auch einige Limitierungen. Beispielsweise ist die Anzahl an Ionen, mit der die Orbitrapzelle gefüllt werden kann, begrenzt, sodass der dynamische Bereich, welcher im MS^1 erreicht werden kann, limitiert ist. Als Parameter für die Anzahl an gesammelten Ionen wird der sogenannte AGC-Zielwertes (*automatic gain control*) sowohl auf MS^1 als auch MS^2 -Ebene festgelegt. Zum Erreichen dieses Zielwertes wird eine bestimmte Zeit (*injection time*) vorgegeben.

Des Weiteren kann die Analyse einer hochabundanten Spezies in der Orbitrapzelle zu sogenannten Space-Charging-Effekten führen, in dessen Folge die Massengenauigkeit signifikant abnimmt und Massenfehler > 3 ppm auftreten. Dessen ungeachtet ist das DDA-Experiment die Methode der Wahl zur Charakterisierung von bekannten und unbekannten Proteinmodifikationen.

Bei der *targeted* Proteomik konzentriert man sich auf einzelne Proteine oder Proteinabschnitte, welche zuvor identifiziert wurden oder bekannt sind. Anhand dieser Vorkenntnisse werden einzelne Peptide, meist unter Berücksichtigung ihrer Retentionszeit, gezielt selektiert und fragmentiert. Um die Selektivität zusätzlich zu erhöhen, wird sich nicht nur auf ein Fragmention beschränkt, sondern mehrere Fragmente erfasst. Dieses MRM wird häufig bei Triplequadrupolinstrumenten (QQQ) angewendet, die einen hohen linearen Bereich für die Quantifizierung aufweisen.⁹³ Neben QQQ-Instrumenten werden zunehmend Orbitrapgeräte für solche gezielten proteomischen Fragestellungen eingesetzt. In diesem Fall wird von *parallel reaction monitoring* (PRM) gesprochen, da das komplette MS^2 Spektrum erfasst wird.⁹⁴ Targeted Proteomikansätze kommen bei der Charakterisierung von Proteinmodifikationen eine besondere Bedeutung zu, da sie es ermöglichen auch niedrig abundante Precursorionen reproduzierbar zu detektieren. Basis dafür ist jedoch deren vorangegangene Identifizierung.

In datenunabhängigen Methoden werden mehrere Precursorionen parallel fragmentiert. Die Zuordnung der Fragmentionen zu ihren jeweiligen Precursorion erfolgt über die gezielte Signalerkennung

anhand zuvor akquirierter Einzelpeptidfragmentationenspektren oder durch die Erzeugung von Pseudofragmentationenspektren, welche aus den DIA-Daten gewonnen werden.^{95, 96} Der entscheidende Vorteil gegenüber dem DIA-Ansatzes besteht darin, dass der überwiegende Teil des Spektrums an Precursorionen, welches durch den Dynamikbereich abgedeckt ist, nahtlos erfasst wird. Nachteilig ist, dass Fragmentationenspektren zur Identifizierung von Peptiden aus den DIA-Daten *a priori* generiert werden müssen.^{95, 97, 98} DIA ermöglicht die reproduzierbare Identifizierung von bis zu 5900 Proteinen innerhalb einer halben Stunde Analysenzeit.⁹² Die Charakterisierung und Lokalisierung unbekannter Modifikationen ist aufgrund der inhärenten Komplexität der MS²-Spektren derzeit jedoch nicht möglich.

Neben diesen Ansätzen werden komplett neue Methoden entwickelt, um die beschriebenen Limitierungen zu egalisieren. So ist es beispielsweise seit kurzem möglich, verschiedene Precursorionen parallel in einem Ionenmobilitätsinstrument, nach ihrer Größe und Form zu trennen und anschließend sequentiell zu fragmentieren. Dieser Ansatz der parallelen Akkumulation und seriellen Fragmentierung (PASEF™) ermöglicht eine besonders schnelle und empfindliche Fragmentierung und hat das Potential isobare Ionen voneinander zu trennen,⁹⁹ eine Eigenschaft, welche beispielsweise bei der Unterscheidung isomerer Phosphopeptide zum Tragen kommt.¹⁰⁰

Für die Quantifizierung von Proteinen und deren Modifikationen stehen ausgereifte Methoden, welche chemisches oder metabolisches Labeling nutzen, zur Verfügung.¹⁰¹⁻¹⁰⁵ Für diese Verfahren sind Limitierungen in Bezug auf den dynamischen Bereich oder die Richtigkeit der Quantifizierung dokumentiert.^{106, 107} Verbesserungen in der erzielten Auflösung von Massenspektrometern in Kombination mit Fortschritten bei der Entwicklung von Algorithmen haben dazu geführt, dass labelfreie Quantifizierungsmethoden vermehrt bei DDA-, SRM- und DIA-Ansätzen genutzt werden.^{95, 98, 108, 109}

Da der Fokus dieser Arbeit auf der Entwicklung *bottom-up*-proteomischer Ansätze zur Identifizierung labiler, endogener Phosphorylierungen lag, sollen in den folgenden Kapiteln besonders relevante Abschnitte wie die Anreicherung labiler Phosphorylierungen, deren Fraktionierung und tandemmassenspektrometrische Erfassung sowie Quantifizierung beleuchtet werden.

1.2.2 Verfahren zur Anreicherung von Phosphopeptiden

Phosphorylierte Peptide treten in einem *bottom-up*-Proteomikansatz allgemein in substöchiometrischen Mengen auf und haben eine geringere Ionisierungseffizienz als ihr unmodifizierter Counterpart.¹¹⁰ Vor diesem Hintergrund wurde ein breites Spektrum an Anreicherungsverfahren entwickelt. Den größten Anteil nehmen dabei die metallbasierten Affinitätsanreicherungen der immobilisierten Metallionenaffinitätschromatographie (IMAC) und der Metalloxidaffinitätschromatographie (MOAC) ein, welche auf der elektrostatischen Wechselwirkung der Phosphorylierung mit einer Festphase basieren. Bei IMAC werden Übergangsmetallkationen (Fe³⁺, Ga³⁺, Zr⁴⁺, usw.) verwendet, an die die negativ geladenen Phosphatgruppen der Phosphopeptide binden.^{111, 112} Die Immobilisierung dieser Kationen

erfolgt über Chelatkomplexe, welche an magnetische Kügelchen oder silikabasierte Harze gebunden sind. Die neueste Generation von IMAC-Verfahren beruht auf einer Titanium(IV)-Spezies (Ti^{4+}).¹¹³

MOAC nutzt ebenfalls die Affinität des Sauerstoffs gegenüber Metallen, welche Bestandteil einer Matrix sind. Als Metalloxide werden Zirkoniumoxid (ZrO_2), Magnetit (Fe_3O_4) und Titaniumoxid (TiO_x) eingesetzt, wobei letzteres mit Abstand am weitesten verbreitet ist.¹¹⁴⁻¹¹⁷

Die Abtrennung der Phosphopeptide erfolgt bei beiden Techniken entweder über Säulen- oder Batchverfahren. Sowohl IMAC als auch MOAC sind in der Phosphoproteomik weit verbreitete Standardverfahren und wurden in den vergangenen Jahren kontinuierlich weiterentwickelt. Welches der beiden Verfahren jedoch am besten für die Anreicherung von phosphorylierten Peptiden geeignet ist, wird kontrovers diskutiert. Vor diesem Hintergrund werden zunehmend kombinierte oder sequentielle Anreicherungsstrategien eingesetzt. So werden Kombinationen von Eisen- und Zirkonium-IMAC, Eisen- und Titanium-IMAC, oder Gallium-IMAC zusammen mit TiO_x genutzt um verschiedene Phosphopeptidspezies anzureichern.¹¹⁸⁻¹²⁰ Weitere Optimierungen umfassen den Einsatz von Komplexbildnern, wie Nitrilotriessigsäure (NTA) und Iminodiessigsäure (IDA),¹²¹ sowie die Zugabe von Additiven, wie Glycerol, bis-Trispropan, Zitronensäure oder sauren Aminosäuren.¹²²⁻¹²⁴ Sogar verschiedene Partikelgrößen wurden untersucht, um die Effizienz von MOAC-Harzen zu verbessern.¹²⁵ All diese Arbeiten dienen vor allem einem Zweck: Sie sollen die Reproduzierbarkeit, Selektivität und analytische Tiefe der Anreicherungsverfahren erhöhen. Obwohl es heute möglich ist, mehrere tausend serin-, threonin- und tyrosinphosphorylierte Peptide anzureichern und zu identifizieren, ist die Übereinstimmung an Phosphopeptiden, welche mit verschiedenen, etablierten Verfahren angereichert werden, gering.¹²⁶

Lange Zeit ist man davon ausgegangen, dass diese metallbasierten Methoden nur bedingt für die Anreicherung säurelabiler Phosphorylierungen geeignet sind, da für die Beladung der Harze saure Bedingungen gewählt werden, um unspezifische Bindungen zu reduzieren. Dies wurde durch eine kürzlich erschienene Arbeit von Potel *et al.* widerlegt.²⁶ Mit Hilfe eines Fe^{3+} -IMAC-Verfahrens und milden Beladungs- und Waschbedingungen sowie kurzen Beladungszeiten gelang die umfangreiche Anreicherung säurelabiler Phosphohistidinpeptide. Das Verfahren übertraf etablierte antikörperbasierte Verfahren, ist kostengünstiger und einfacher in der Handhabung. Das damit angereicherte *E.coli*-Phosphoproteom wies einen unerwartet hohen Anteil an Histidinphosphorylierungen auf.²⁶ Darüber hinaus nutzten Junker *et al.* ein TiO_x -basiertes Anreicherungsverfahren zur umfassenden Analyse von Argininphosphorylierungen in *Staphylococcus aureus*.³⁶

Neben IMAC und MOAC wurden verschiedene Immunoanreicherungen entwickelt. Allen voran die Einführung von pTyr-spezifischen Antikörpern und deren Einsatz in phosphoproteomischen Ansätzen^{127, 128} hat zu einem tieferen Verständnis der biologischen Funktion dieser posttranslationalen Modifikation beigetragen.¹²⁹⁻¹³¹ Diese Arbeiten waren eine Blaupause für das Feld der labilen Phosphorylierungen, auf dem ebenfalls antikörper-basierte und weitere selektive Anreicherungsverfahren unabhängig von IMAC und MOAC entwickelt wurden.

1.2.3 Selektive Anreicherung labiler Phosphorylierungen

Besondere Anforderungen gelten für die Anreicherung labiler Phosphorylierungen. Neben dem substöchiometrischen Auftreten und der reduzierten Ionisierungsfähigkeit gilt es die inhärente Säurelabilität der Modifikationen zu berücksichtigen.

In Anbetracht dessen wurde mit Hilfe des stabilen Analogons Phosphoryl-Triazolethylamin (pTze), dessen heterocyclische Struktur eine hohe Übereinstimmung mit der Größe und Struktur des stabileren τ -pHis-Isomers aufweist (vgl. Abbildung 12), ein pan-spezifischer Antikörper für die Anreicherung von pHis-Peptiden entwickelt.¹³² Dieser Antikörper zeigte eine hohe Affinität für pHis, wies jedoch auch eine signifikante Kreuz-Reaktivität mit pTyr auf. Diese Limitierung wurde durch eine zweite Generation von Analoga (Phosphonopyrazolyethylamin (pPye) und 4-Phosphopyrazolyl-2-ylalanin (pPza)), welche zur Herstellung hochselektiver, polyklonaler Antikörpern führte, überwunden.^{133, 134}

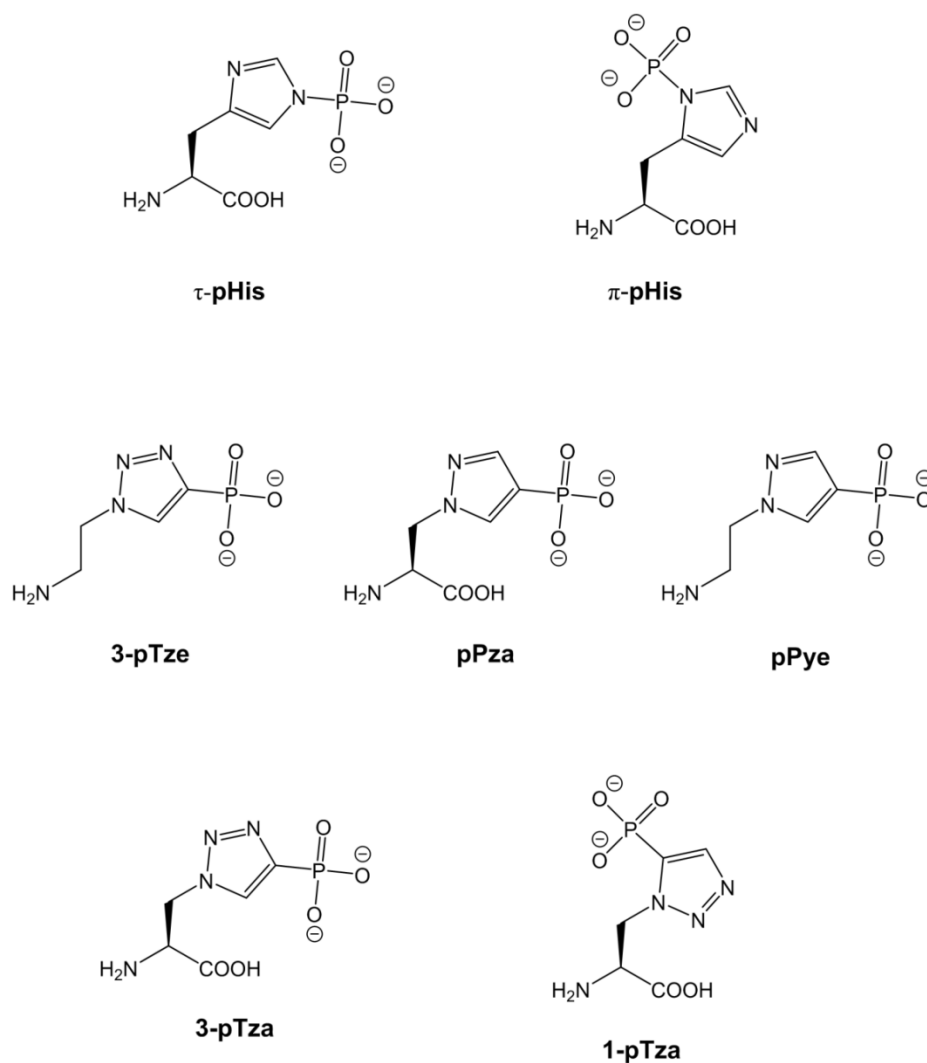


Abbildung 12: Gegenüberstellung der Histidinisomere π -pHis und τ -pHis mit ihren säurestabilen Analoga zur Herstellung von pHis-spezifischen Antikörpern.¹³²⁻¹³⁵

Die Gruppe um Tony Hunter ging noch einen Schritt weiter. Mit Hilfe der Analoga 1- und 3-Phosphotriazolylalanin (1-pTza und 3-pTza)¹³⁵, eingebaut in randomisierten Peptidsequenzen, gelang ihnen die Generierung der ersten monoklonalen Antikörper (mAbs), welche in der Lage waren die Isomere π -pHis und τ -pHis voneinander zu unterscheiden.¹³⁶ Diese Entwicklung führte zu umfassenden Untersuchungen der Histidinphosphorylierung in Bakterien- und Säugetierzellen.¹³⁷⁻¹³⁹

Für die selektive Anreicherung von argininphosphorylierten Peptiden wurde ebenfalls die Entwicklung von sequenzunspezifischen Antikörpern forciert. Als stabile Analoga wurden dafür das Phosphonatamidin 2-((6-Aminohexyl)amino)-2-iminoethyl)-phosphonsäure (6-pAIE) und das Sulfonatamidin 2-((6-aminohexyl)amino)-2-iminoethane-1-sulfonsäure (6-sAIE) erprobt (vgl. Abbildung 13).¹⁴⁰ Beide Isostere weisen zwar eine ähnliche Geometrie wie pArg auf, jedoch besitzt nur die Phosphonatgruppe formal zwei negative Ladungen, wohingegen die Sulfonatgruppe lediglich eine trägt. Daraus resultierte, dass nur das 6-pAIE-Hapten Klone generierte, die selektiv pArg banden. Parallel wurde gezeigt, dass auch 2-((2-ammonioethyl)amino)-2-iminoethyl)-phosphonsäure (2-pAIE) als Analogon für die effektive Erzeugung von pArg-spezifischen Antikörpern fungieren kann.¹⁴¹

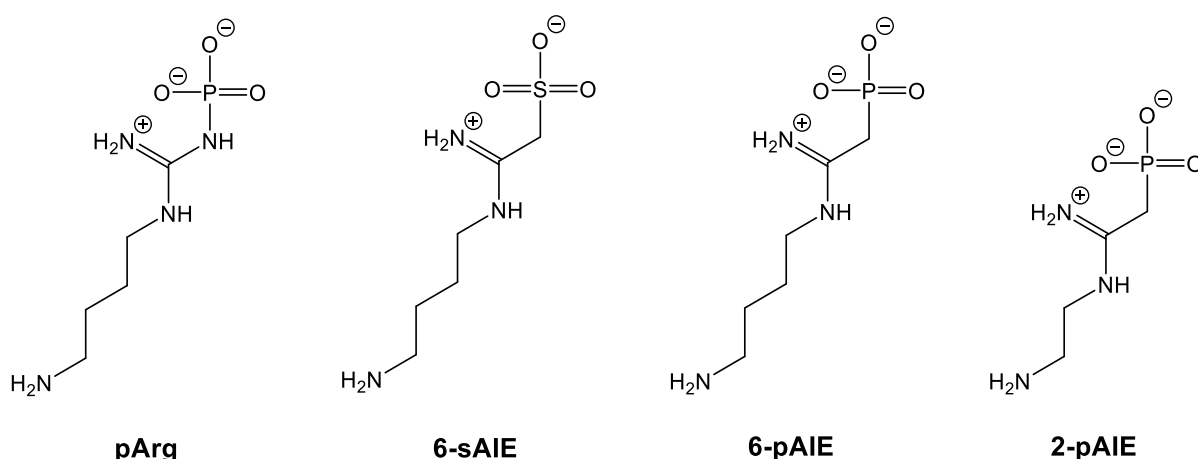


Abbildung 13: Gegenüberstellung von Phosphoarginin mit deren säurestabilen Analoga zur Herstellung von pArg-spezifischen Antikörpern.^{140, 141}

Eine grundlegend andere Strategie zur Identifizierung von pArg-Peptiden nutzt eine Mutante der Argininphosphatase YwIE_{G.ste}.¹⁴² Dieser spezifische Binder wird an einer Festphase immobilisiert und bindet phosphoargininenthaltende Proteine und Peptide.

Obwohl Cysteinphosphorylierungen bereits in prokaryotischen und eukaryotischen Systemen nachgewiesen wurden und davon ausgegangen wird, dass diese eine elementare Rolle bei der Signaltransduktion in Zellen spielen, fehlt es bislang an leistungsfähigen Werkzeugen um cysteinphosphorylierte Peptide und Proteine anzureichern. Es ist anzunehmen, dass neben der chemischen Labilität, die er-

hebliche, strukturelle Ähnlichkeit mit den hochabundanten, ubiquitär verbreiteten Serinphosphorylierungen eine große Herausforderung bei der Entwicklung eines pCys-spezifischen Anreicherungsverfahrens darstellen.

Seit ihrer ersten Erwähnung auf dem Histon H1 in den siebziger Jahren des vergangenen Jahrhunderts ist es über proteomische Methoden bislang nicht gelungen die Existenz der Lysinphosphorylierung auf dem Histon H1 *in vivo* nachzuweisen. Der hohe Grad an verschiedenen Modifikationen, das anspruchsvolle chromatographische und massenspektrometrische Verhalten terminaler Histonpeptide und die dokumentierte Säurelabilität sind nur einige mögliche Gründe dafür warum der direkte Nachweis bislang nicht gelungen ist.^{60, 69} Daher sind die Synthese von stabilen pLys-Analoga und die Generierung eines pan-spezifischen Antikörpers von besonderem Interesse. Auch die selektive Anreicherung von Histonproteinen könnte eine Strategie sein, um entscheidend zur Identifikation von pLys auf dem Histon H1 beizutragen.

Für die Anreicherung pyrophosphorylierter Peptide wurde von der Gruppe um Dorothea Fiedler kürzlich ein Affinitätsreagens entwickelt.¹⁴³ Dieser dinukleare Zink(II)-Komplex wird an ein Harz gebunden und ist in der Lage serin- und threoninpyrophosphorylierte Peptide in Gegenwart eines komplexen Zelllysates einzufangen und wieder abzugeben (vgl. Abbildung 14). Während der Anreicherung werden unerwünschte, unspezifisch gebundene Peptide mittels anorganischem Phosphat (P_i) vom Harz gewaschen und die gebundenen Pyrophosphopeptide mit anorganischem Pyrophosphat (PP_i) eluiert. Dieser synthetische Rezeptor weist eine höhere Affinität gegenüber Diphosphateestern als gegenüber anderen anionischen funktionellen Gruppen, wie Monophosphatester, Sulfatester und Carboxylsäuren auf und könnte ausschlaggebend bei der Identifikation der Proteinpyrophosphorylierung *in vivo* sein.

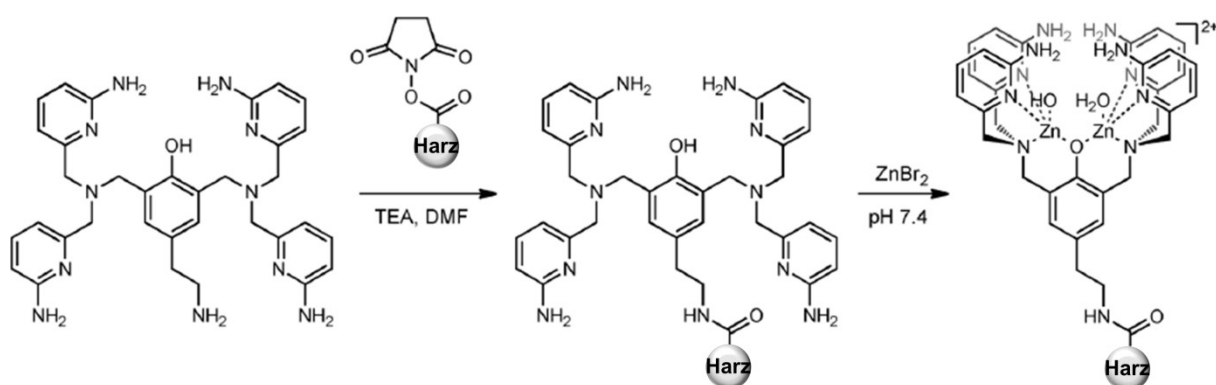


Abbildung 14: Syntheseroute für die Herstellung des harzgebundenen, dinuklearen Zink(II)-komplexes, welcher zur Anreicherung pyrophosphorylierter Peptide eingesetzt wird.¹⁴³

Zusätzlich zu den diversen Anreicherungsverfahren wurden verschiedene chromatographische Trenntechniken für die Trennung komplexer Peptidgemische entwickelt.

1.2.4 Trennungs- und Fraktionierungstechniken

Die Peakkapazität und der dynamische Bereich eines Phosphoproteomikansatzes reichen trotz effizienter Anreicherungsverfahren meist nicht aus, um das komplexe Peptidgemisch, hinreichend zu erfassen.¹⁴⁴ Daher wird allgemein vor der HPLC-MS ein zusätzlicher Trennungsschritt implementiert. Die Fraktionierung erfolgt auf Proteinebene mit Hilfe ein- und zweidimensionaler Gelelektrophorese (1DE und 2DE) oder chromatographischer Techniken.¹⁴⁵⁻¹⁴⁷

Auf Peptidebene wird vor allen Dingen die mehrdimensionale Chromatographie bei der Klärung komplexer, proteomischer Fragestellungen genutzt. Da die Kopplung der Reversed-Phase Chromatographie mit der Tandemmassenspektrometrie in der letzten Dimension die Methode der Wahl ist, wurden zahlreiche dazu komplementäre Trenntechniken, welche sowohl online als auch offline vor der eigentlichen HPLC-MS/MS eingesetzt werden, etabliert.¹⁴⁸ Theoretisch sind diverse, aufeinander folgende Verfahren denkbar. Aufgrund der hohen Empfindlichkeit und Schnelligkeit moderner Massenspektrometer wird sich in der Regel auf eine zusätzliche Trenntechnik in einem sogenannten 2D-LC-MS-Ansatz beschränkt. Die Leistungsfähigkeit einer solchen 2D-LC-Trennung hängt von verschiedenen Faktoren ab: Zum einen sollte eine hohe Kompatibilität zwischen der ersten und der zweiten Dimension bestehen. Zum anderen wird eine hohe Peakkapazität für die erste Trennung angestrebt. Nicht zuletzt ist eine ausreichende Orthogonalität in Bezug auf den Trennmechanismus zwischen beiden Dimensionen essentiell für eine effektive Fraktionierung.¹⁴⁹

Weit verbreitet unter den Trenntechniken ist die zu den Ionenaustauschchromatographien (IEX) zählende, starke Kationenaustauschchromatographie (SCX). Diese wird bei der Analyse von Phosphopeptiden meist mit weiteren, metallbasierten Anreicherungsverfahren kombiniert.¹¹¹ Beispielsweise wurde SCX in Kombination mit TiO_2 erfolgreich bei der Anreicherung von Phosphotyrosin eingesetzt.¹⁵⁰ Auch die Isolation von Phosphopeptiden ohne einen zusätzlichen Anreicherungsschritt konnte mit Hilfe von SCX und dem Einsatz verschiedener, komplementärer Puffersysteme gezeigt werden.¹⁵¹ Darüber hinaus lassen sich mittels Ionenaustauschchromatographie bestimmte Aminosäuresequenzen an- bzw. abreichern. So werden beispielsweise Phosphopeptide mit sauren Aminosäureabschnitten mit Hilfe der starken Anionenaustauschchromatographie (SAX) abgetrennt. Dies ist von Bedeutung, wenn man sich auf Sequenzabschnitte konzentrieren möchte, welche vermehrt von basophilen Kinasen phosphoryliert werden oder ein gesteigertes Interesse an sauren Aminosäuresequenzen besteht.¹⁵²

Neben der IEX hat die Hydrophile Interaktionschromatographie (HILIC) vermehrt Anwendung in der Proteomik gefunden. Dieses Trennverfahren nutzt eine polare stationäre Phase und einen binären Gradienten aus organischer bis polarer mobiler Phase. Die Trennung richtet sich nach der Hydrophilie der einzelnen Peptide, wobei die Elutionsreihenfolge entgegengesetzt zur RP-HPLC ist. HILIC wird als zusätzliche orthogonale Trenntechnik und in Verbindung mit metallbasierten Anreicherungsverfahren und SCX-Trennungen eingesetzt.^{153, 154}

Eine weitere Methode, welche sich bei der Analyse von Phosphopeptiden etabliert hat, ist die *electrostatic repulsion-hydrophilic interaction chromatography* (ERLIC). Sie vereint die Prinzipien von HILIC und Anionenaustauschchromatographie. ERLIC wird sowohl zur Anreicherung von Phosphopeptiden als auch als multidimensionale Fraktionierungsmethode eingesetzt.¹⁵⁵⁻¹⁵⁷ In einer vergleichenden Studie gelang es mit ERLIC mehr als doppelt so viele Phosphopeptide anzureichern als mittels herkömmlichen Ionenaustauschverfahren.¹⁵⁸

Trotz bemerkenswerter Weiterentwicklungen auf verschiedenen Gebieten der Chromatographie hat sich in den letzten Jahren vor allen Dingen die Fraktionierung mit Hilfe der RP-HPLC unter basischen pH-Werten durchgesetzt.¹⁵⁹ Vergleiche zwischen RP- und SCX-Fraktionierungen zeigten erhebliche Vorteile des RP-Ansatzes gegenüber der Ionenaustauschchromatographie. In vier biologischen Replikaten ließen sich nach TiO₂ Anreicherung mehr als doppelt so viele Phosphopeptide mit Hilfe der basischen RP-Fraktionierung nachweisen. Weitere Optimierungen der chromatographischen und massenspektrometrischen Bedingungen führten sogar zu einer Vervierfachung der identifizierten Phosphopeptiden.^{160, 161} Die Gründe für diese signifikanten Unterschiede sind mannigfaltig: Allen voran verfügt die RPLC über eine höhere Peakkapazität.¹⁴⁹ Des weiteren werden Laufmittel verwandt, welche keine oder nur geringe Mengen an Salz enthalten. Die einzelnen Fraktionen weisen somit eine hohe Kompatibilität mit der anschließenden LC-MS auf. Im Gegensatz dazu müssen SCX-Fractionen im Allgemeinen entsalzt werden, was sich negativ auf die Empfindlichkeit auswirken kann. Ein wichtiges Charakteristikum der SCX ist deren hohe Orthogonalität in einem SCX-RP-HPLC-Ansatz. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass auch in einem 2D-RP-HPLC-RP-HPLC-MS-Ansatz eine vergleichbare Orthogonalität erreicht werden kann. Basis dafür ist eine große pH-Differenz zwischen beiden Dimensionen. So werden idealerweise pH-Werte von 10 in der ersten Dimension und pH-Werte ≤ 3 für die LC-MS eingesetzt.¹⁶²⁻¹⁶⁴ Die Unterschiede in der Selektivität der Trennung resultieren aus den verschiedenen Ladungsverteilungen innerhalb der Peptidkette hervorgerufen durch den Wechsel des pH-Wertes.¹⁶⁵

Um nicht jede Fraktion einzeln in der zweiten Dimension analysieren zu müssen, wurden zweckmäßige Fraktionierungstechniken entwickelt wobei Fraktionen, die frühzeitig eluieren, mit Fraktionen aus der Mitte und des Endes des Chromatogramms miteinander vereinigt werden (vgl. Abbildung 15). Diese Strategie ermöglicht es, die Anzahl an gemessenen Fraktionen und die damit verbundene Gesamtmeszeit für einen Proteomikansatz zu reduzieren, ohne an analytischer Tiefe zu verlieren.¹⁶⁶ Die Anzahl der vereinigten Fraktionen richtet sich dabei nach dem Trennvermögen der ersten Dimension und der Komplexität der Probe.

Für die Fraktionierung säurelabiler Protein- und Peptidmodifikationen kommen im Wesentlichen Ionenaustauschchromatographien sowie die basische RP-HPLC mit pH-Werten von 8 in Frage.

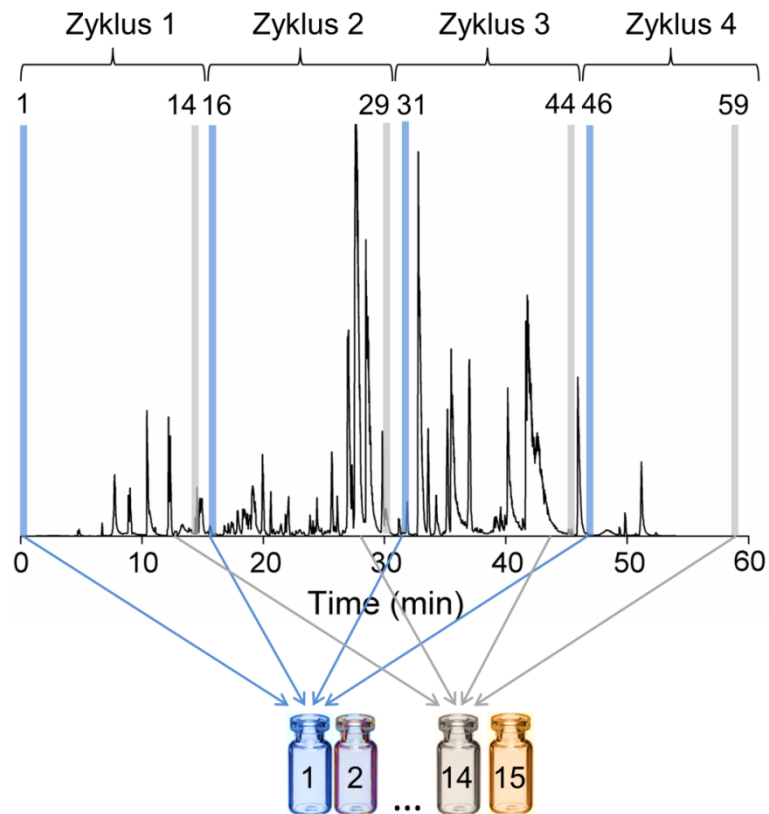


Abbildung 15: Schema der Fraktionierung in einem 2D-RPLC-RPLC-MS-Ansatz.

In diesem Beispiel nimmt die chromatographische Trennung der ersten Dimension 60 min in Anspruch. Innerhalb dieser Zeit erfolgt die Fraktionierung in Form von vier sich wiederholenden Zyklen, wobei ein Zyklus einen Zeitraum von 15 min umfasst. Innerhalb dieser Zeit werden 15 Fraktionen mit einer Dauer von jeweils 1 min gesammelt. Dieser Zyklus wiederholt sich im Anschluss, sodass die Fraktionen 1, 16, 31 und 46 miteinander vereinigt werden und sich die Gesamtanzahl an Fraktionen von 60 auf 15 reduziert.

Nachdem in den vorangegangenen Kapiteln verschiedene Wege aufgezeigt wurden wie sich labile Phosphorylierungen anreichern und abtrennen lassen, so soll als nächstes der aktuelle Kenntnisstand in Bezug auf die massenspektrometrische Analyse von modifizierten Proteinen und Peptiden skizziert werden.

1.2.5 Tandemmassenspektrometrische Analyse von Proteinen und Peptiden

Die Tandemmassenspektrometrie, kurz MS/MS oder MS², ist eine der vielseitigsten und leistungsfähigsten Methoden, um die Struktur eines Peptidmoleküls aufzuklären. Hochauflösende Massenspektrometer (*high resolution mass spectrometry*, HRMS) und deren hohe Massengenauigkeit erlauben es zwar, die Elementarzusammensetzung eines Peptides zu bestimmen, die Aminosäuresequenz lässt sich daraus jedoch nicht ableiten. Um diese Information zu erhalten, muss das Peptid oder Protein einer Fragmentierung unterzogen werden. Der allgemeine Ablauf eines solchen tandemmassenspektrometrischen Experiments setzt sich aus der Selektion und Isolation eines Vorläuferions (auch Precursorion genannt), dessen Manipulation durch Energiezufuhr und der Detektion der entstandenen Fragmentionen (Produktionen) zusammen. Die Energiezufuhr kann dabei in multiplen kleinen Schritten, durch beispielweise Stöße, oder in einem schnellen Schritt durch Absorption eines UV-Photons erfolgen. Die Geschwindigkeit und der Betrag mit der die Energie zugeführt wird, haben einen wesentlichen Einfluss auf die Art und relative Abundanz der entstehenden Fragmentionen. Um zusätzliche strukturelle Informationen von Fragmentionen zu erhalten, können diese wiederum isoliert und fragmentiert werden. Dieser Prozess wird als MSⁿ bezeichnet.

Für die Analyse von Proteinen und Peptiden werden verschiedene Anregungstechniken eingesetzt. Diese können auf der Kollision mit Gasmolekülen, Wechselwirkungen mit Elektronen, elektronenübertragenden- oder elektronenaufnehmenden Reagenzien oder der Absorption von Photonen beruhen. Viele dieser Techniken sind komplementär zueinander, sodass deren paralleler Einsatz das Spektrum an Informationen über die Struktur eines Peptides oder Proteins erweitern kann. Eine universelle Fragmentierungstechnik, welche in der Lage ist alle Fragestellungen der Protein- und Peptidanalytik zu beantworten, existiert jedoch bislang noch nicht.

Zur Einordnung der verschiedenen Arten von Fragmentionen wurde von Roepstorff und Fohlman eine Nomenklatur eingeführt.¹⁶⁷ Darin repräsentieren alphabetische Buchstaben die Art der gespaltenen Bindung und Zahlen die Position der Spaltungsstelle im Vergleich zum *N*-oder *C*-Terminus (vgl. Abbildung 16). Allgemein werden Ionen, welche den *N*-Terminus des Peptides enthalten, als a-, b- und c-Ionen bezeichnet, wohingegen Ionen die den *C*-Terminus beinhalten, als x-, y- und z-Ionen definiert werden. Verfolgt man das Peptidrückrat vom *N*- zum *C*-Terminus so sind C_α-C, C-N und N-C_α Spaltungen, welche zu komplementären Paaren aus a-/x-, b-/y- und c-/z-Ionen führen, möglich. Zusätzlich zu den beschriebenen Ionenpaaren sind interne Fragmentionen, welche aus der multiplen Spaltung des Peptidrückrates oder Sekundärspaltungen von Fragmentionen stammen und den *N*- oder *C*-terminalen Teil verloren haben, möglich. Außerdem können Immoniumionen, welche aus einem einzelnen Aminosäurerest bestehen, gebildet werden (vgl. Abbildung 17). Produktionen, die ihre Seitenkette verloren haben, werden als d-, v- und w-Ionen bezeichnet, wiederum in Abhängigkeit davon, ob diese vom *N*- oder *C*-Terminus stammen.

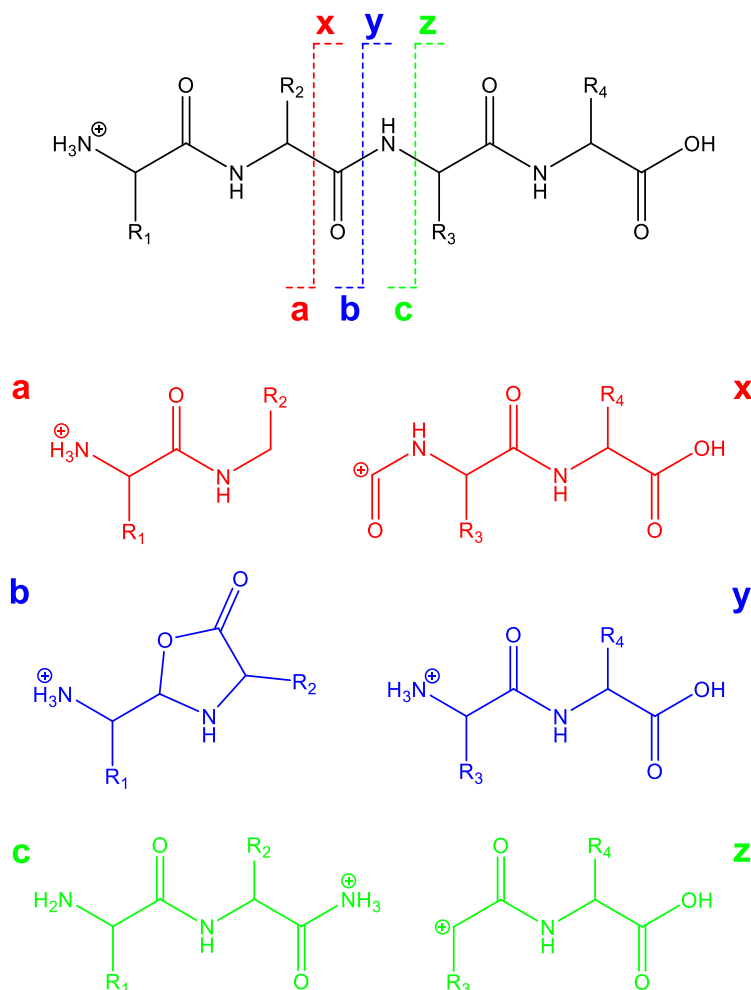


Abbildung 16: Typen von Fragmentionen, deklariert nach der Nomenklatur von Roepstorff und Fohlman.^{167, 168}

Immoniumionen

interne Fragmentionen

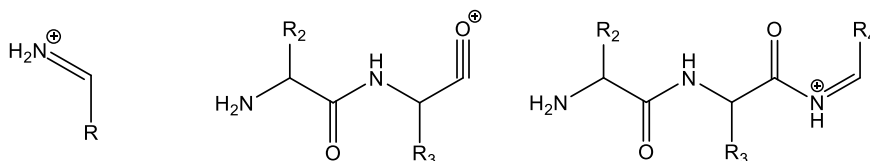


Abbildung 17: Fragmentionen außerhalb der Nomenklatur von Roepstorff und Fohlman.¹⁶⁸

Dissoziationsprozesse niedriger Energie, wie zum Beispiel der Kollisionsinduzierten Dissoziation (*collision induced dissociation*, CID) und einiger Arten der Photodissoziation, bewirken hauptsächlich Spaltungen der Amid-Bindung des Peptidrückrates. Dabei entstehen Ionen der b- und y-Serie. Außerdem sind Verluste von NH_3 oder H_2O , sowie die Bildung von a-Ionen, welche möglicherweise durch den Verlust von CO an b-Ionen resultieren, häufig detektierte Fragmentionen. Im Gegensatz dazu erzeugen elektronenbasierte Methoden wie die *electron capture dissociation* (ECD) oder die *electron*

transfer dissociation (ETD) c- und z-Ionen, welche aus der Spaltung der N-C α -Bindung resultieren. Fragmentierungstechniken mit höherem Energieeintrag, dazu zählen die UV-Photodissoziation (*ultra-violet photodissociation*, UVPD) mit 193 nm, sind in der Lage, C α -C-Bindungen zu spalten und erzeugen neben b-/y- und c-/z- auch a-/x-Ionen.

Im weiteren Verlauf werden die wichtigsten Fragmentierungstechniken näher beschrieben, wobei der Fokus auf den in dieser Arbeit eingesetzten Methoden liegt. Weiterführende Informationen zu nicht berücksichtigten Techniken sind dem umfangreichen Übersichtsartikel von Brodbelt zu entnehmen.¹⁶⁸

1.2.5.1 Kollisionsbasierte Fragmentierungstechniken

Aufgrund ihrer Schnelligkeit, Empfindlichkeit, Robustheit und geringen Anschaffungskosten ist die CID die am weitesten verbreitete Fragmentierungstechnik und findet Anwendung in nahezu allen Tandemmassenspektrometern (Q-TOF, QQQ, Ionenfallen). Das Verfahren beruht auf der Kollision von Precursorionen mit inerten Gasmolekülen- oder atomen, wie z. B. Stickstoff, Helium oder Argon, wobei ein Teil der kinetischen Stoßenergie in interne Energie umgewandelt wird. Die Akkumulation interner Energie führt letztendlich zur Bindungsspaltung.¹⁶⁹

Ein wesentliches Charakteristikum der CID ist, dass die Energieübertragung in einem schrittweisen Prozess aufgrund multipler Kollisionen erfolgt. Als Folge dessen kann der Energiebetrag, welcher übertragen wird, limitiert sein und eine Bevorzugung niedrig energetischer Fragmentierungswege auftreten. Diese Limitierung der CID führt zur Spaltung der labilsten Bindungen und bewirkt meist die Abspaltung wenig informativer Neutralverluste wie H₂O, CO, CO₂ und NH₃.¹⁷⁰ Ein weiterer Nachteil der niedrig energetischen CID, wie sie in Ionenfallengeräten angewandt wird, ist der sogenannte *low mass cutoff* (LMCO). Dieser beschreibt den Verlust von Fragmentionen mit niedrigem *m/z*-Verhältnis, was insbesondere bei der Detektion von kurzen *N*-terminalen und *C*-terminalen Fragmentionen von Bedeutung ist. Grund dafür sind die verwendeten Radiofrequenzspannungen, welche die Speicherung und Detektion kleiner Fragmente nicht ermöglichen.

Diese Limitierung wurde weitestgehend durch die Einführung der höher energetischen kollisionsinduzierten Dissoziation (*higher-energy collisional dissociation*, HCD) überwunden.¹⁷¹ Hierbei werden die Precursorionen in einer separaten Kollisionszelle oder einem Multipol angeregt, sodass der Fragmentierungsprozess unabhängig von den Stabilisierungsparametern ist und auch Fragmentionen mit niedrigem *m/z*-Verhältnis detektierbar sind (vgl. Abbildung 18). Darüber hinaus ist der Betrag an überführter Energie höher als bei konventioneller CID in Ionenfallen.

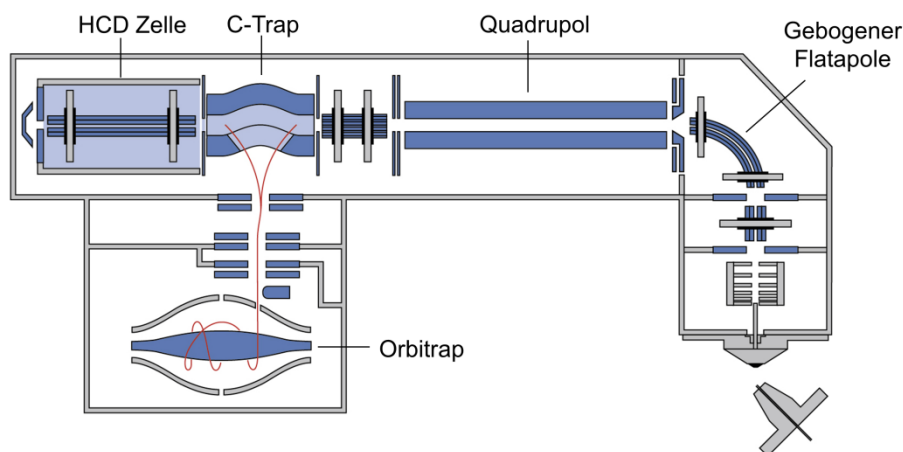


Abbildung 18: Schematische Darstellung eines Q-Exactive™ Orbitrap Massenspektrometers.

Deutlich zu erkennen ist die räumliche Trennung von Kollisionszelle (HCD-Zelle) und hochauflösendem Detektor (Orbitrap).

Bis heute gilt die CID als die Methode mit dem alle anderen Fragmentierungstechniken verglichen werden. Neben ihrer Robustheit ist es das zunehmende Verständnis über die Fragmentierungsmechanismen, welche der CID zu ihrer weiten Verbreitung verholfen haben.¹⁷⁰ Insbesondere das Modell des mobilen Protons hat wesentlich zum Verständnis der Fragmentierungswege protonierter Peptide beigetragen.^{172, 173} Das Modell geht davon aus, dass nach der Elektrosprayionisation die Protonen am *N*-Terminus des Peptides oder an basischen Seitenketten wie Lysin-, Arginin oder Histidin lokalisiert sind. Erfolgt eine kollisionsbasierte Aktivierung migrieren ein oder mehrere Protonen zu weniger basischen Positionen in der Peptidkette. Dies kann verschiedene Brüche des Peptidrückrates zur Folge haben. Beispielsweise kann ein mobiles Proton eine Protonierung des Stickstoffes der Peptidbindung hervorrufen, was zur Spaltung der Bindung führt und sich in der Detektion von *b*- und *y*-Ionen äußert (vgl. Abbildung 19).¹⁶⁸ Unspezifische Fragmentierungen werden durch eine höhere Anzahl an Protonen im Vergleich zur Anzahl an basischen Gruppen erklärt.¹⁶⁸

Darüber hinaus kann die Identifikation der gesamten Peptidsequenz über Fragmentierungen des Peptidrückrates, durch Prolin- und Asparaginsäurereste verhindert sein.¹⁷³ So zeigen prolin-enhaltende Peptide und Proteine hoher Ladungszustände bevorzugt Spaltungen der Amidbindung *N*-terminal zum Prolinrest, während Peptide und Proteine mit niedrigem Ladungszustand häufig Spaltungen *C*-terminal zu Säureresten aufweisen.

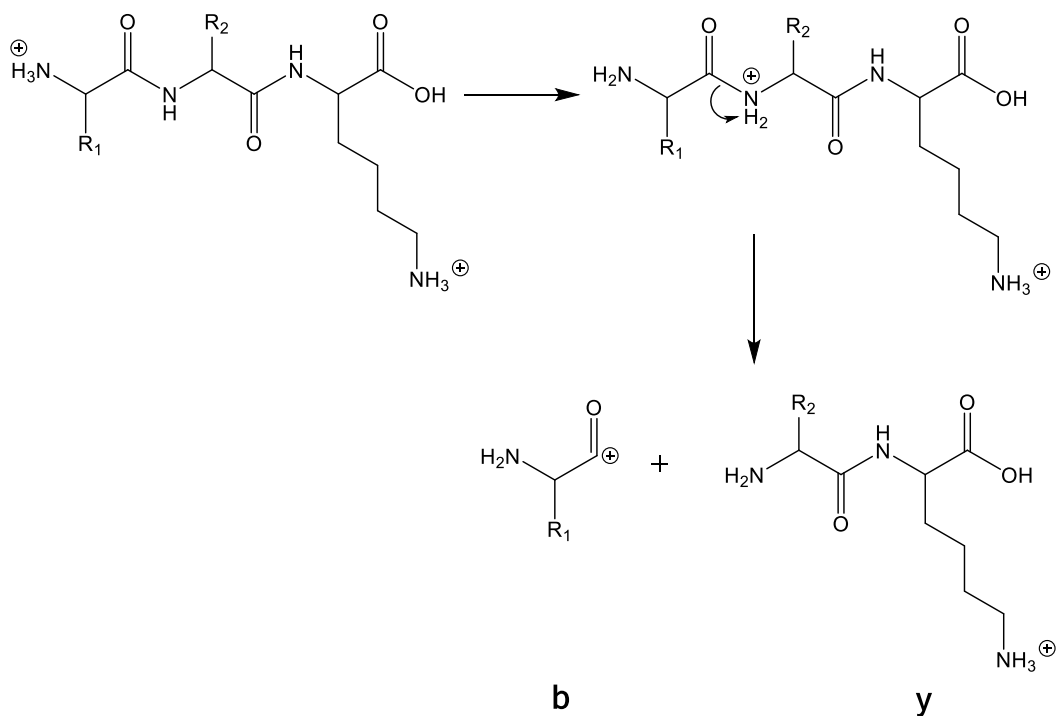


Abbildung 19: Beschreibung des Fragmentierungsverhaltens von Peptiden während der CID anhand des mobilen Protonenmodells.

Nach der Aktivierung erfolgt die Migration eines Protons hin zum Stickstoff der Peptidbindung. Die anschließende Bindungsspaltung führt zur Bildung von b- und y-Ionen.

Ein weiterer entscheidender Nachteil dieser Fragmentierungstechnik besteht in der Labilität zahlreicher Proteinmodifikationen gegenüber den Bedingungen, welche während der CID herrschen.

1.2.5.2 Analyse von Phosphopeptiden mit kollisionsbasierten Fragmentierungstechniken

Da unter CID-Bedingungen bevorzugt die labilsten Bindungen innerhalb eines Moleküls gespalten werden, kann dies zur Abspaltung labiler, endogener oder artifizieller Modifikationen, welche sich als Neutralverlust äußern, führen. Typische Fragmentionenspektren phosphorylierter Peptide sind, in Abhängigkeit von der Art der Phosphorylierung, dominiert von Neutralverlusten von 80 und 98 Da, welche aus der Abspaltung von HPO_3 und H_3PO_4 resultieren. Dieses Verhalten ist in zweierlei Hinsicht problematisch. Zum einen weisen diese Spektren einen geringen Grad an Fragmentierungen entlang des Peptidrückgrates auf, sodass die Identifizierung der Peptidsequenz erheblich beeinträchtigt oder unmöglich ist. Zum anderen erschwert bzw. verhindert der dominante Neutralverlust die zweifelsfreie Positionsbestimmung der Modifikation auf dem Peptid (vgl. Abbildung 20). Ferner sind Umlagerungen der Phosphorylierung, welche die Positionsbestimmung zusätzlich erschweren, dokumentiert.¹⁷⁴

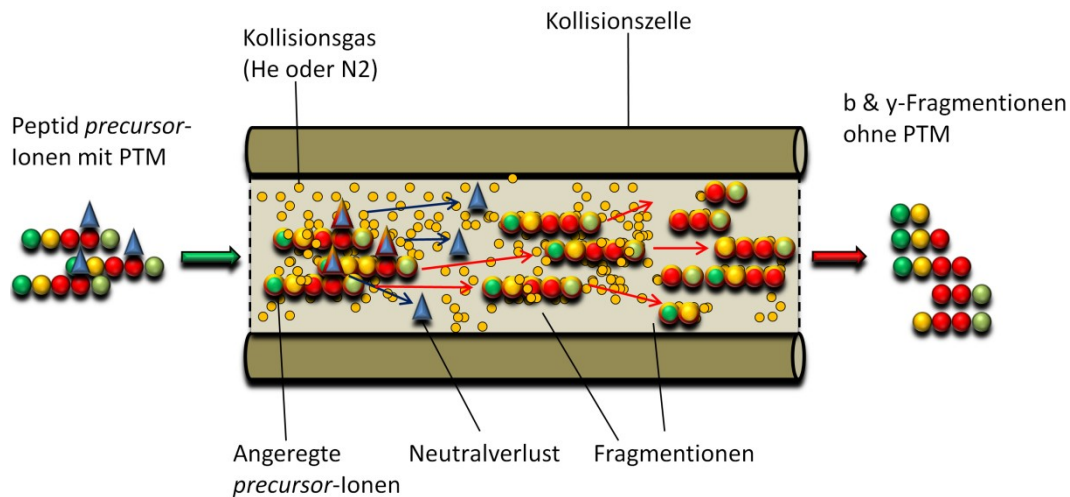


Abbildung 20: Schematische Darstellung der kollisionsbasierten Fragmentierung modifizierter Peptide. Peptid-Precursorionen, welche eine labile Modifikation (z. B. eine PTM) tragen, werden innerhalb einer Kollisionszelle (z.B. einem Quadrupol oder einer Ionenfalle) zu Stößen mit einem inertem Kollisionsgas angeregt. Ein bevorzugter Fragmentierungsweg ist dabei die teilweise oder vollständige Abspaltung der Modifikation von den Aminosäureresten. Die entstehenden b und y-Fragmentationenserien haben die Modifikation verloren.

Um diese Limitierungen zu überwinden, wurden zahlreiche alternative Strategien entwickelt, darunter ein Neutralverlust getriggertes CID MS³ und die sogenannte mehrstufige Aktivierung (*multi stage activation*, MSA), bei der das Neutralverlustfragmention aktiviert wird ohne einen zusätzlichen Isolationszyklus zu durchlaufen.¹⁷⁵⁻¹⁷⁷ Als Stand der Technik für umfassende phosphoproteomische Studien gilt jedoch die HCD-Fragmentierung.^{92, 178} Sie ist nicht nur eine äußerst schnelle und empfindliche Methode. Durch den höheren Energieeintrag im Vergleich zur Ionenfallen-CID weisen die MS/MS-Spektren von Phosphopeptiden einen höheren Informationsgehalt auf. Die Spektren zeigen zwar weiterhin Neutralverluste von 80 und 98 Da, liefern aber gleichzeitig mehr Sequenzinformationen über das Peptid, was sich in höheren Identifizierungsraten im Vergleich zu CID äußert. Da die erfassten MS/MS-Spektren in der Regel hochaufgelöst aufgezeichnet werden, erfolgt eine Steigerung der Identifizierungsrate und der Sicherheit in der Positionsbestimmung einer Phosphorylierung. Da kein low mass cutoff existiert, lassen sich Phosphoimmoniumionen, welche charakteristisch für einen Phosphorylierungstyp sein können, detektieren.^{26, 130, 179} Trotz all dieser Fortschritte bleibt die zweifelsfreie Identifizierung von Phosphorylierungen auch unter HCD-Bedingungen eine Herausforderung.

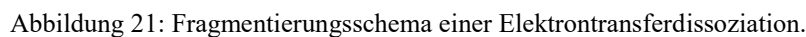
1.2.5.3 Elektronenbasierte Fragmentierungstechniken

Eine sinnvolle Alternative zu den kollisionsbasierten Fragmentierungstechniken stellen die elektronenbasierten Fragmentierungstechniken, wie ECD und ETD dar. ECD basiert auf der Wechselwirkung mehrfach positiv geladener Precursorionen mit Elektronen geringer Energie. Das Einfangen dieser Elektronen erfolgt in einem exothermen Prozess, welcher zur Ladungsreduktion und Fragmentierung des Precursorions führt.¹⁸⁰⁻¹⁸³ Die ECD wird in der Regel im Magnetfeld von FTICR-Massenspektrometern durchgeführt. Diese ermöglichen das gleichzeitige Einfangen von Elektronen und positiv geladenen Precursorionen.¹⁶⁸ Eine Implementierung auf deutlich günstigeren Ionenfallengeräten ist bis dato nicht gelungen. Diese Limitierung konnte mit der Einführung der ETD vor über 10 Jahren überwunden werden.^{184, 185} Dazu werden mehrfach positiv geladene Precursorionen mit einfach geladenen Radikalanionen, typischerweise Fluoranthen, in einer Ionenfalle durch Elektronentransfer zur Reaktion gebracht.¹⁸⁶⁻¹⁹¹

Die Reaktion mit einem Elektron niedriger Energie führt schließlich zur Bildung einer Spezies mit einer ungeraden Anzahl Elektronen (Radikal) und einer leichten Verteilung von Schwingungsenergie bevor es zur Spaltung der N-C α -Bindung des Peptidrückgrates kommt.¹⁶⁸ Die erzeugten ladungsreduzierten Fragmentionen können anschließend weiter fragmentieren, sodass Serien von c- und z $^{\bullet}$ -Ionen entstehen (vgl. Abbildung 21).

Elektronenbasierte Fragmentierungstechniken haben sich in der Vergangenheit als nützlich bei der Charakterisierung von Proteinen und Peptiden erwiesen.^{183, 186, 188, 189} Nichtsdestotrotz ist die Fragmentierungseffizienz sowohl für ECD als auch für ETD stark vom Ladungszustand des Precursorions abhängig. Da für die Dissoziation des Precursorions ein Elektronentransfer erforderlich ist, lassen sich einfach geladene Precursorionen gar nicht und doppelt geladene Precursorionen nur äußerst eingeschränkt fragmentieren. Hohe Fragmentierungseffizienzen werden hingegen bei Ladungszuständen $z \geq 3$ beobachtet.^{190, 192-194}

Dies leitet sich aus der Struktur des Peptidprecursorions in der Gasphase, welche in direktem Zusammenhang mit dessen Ladungszustand steht, ab. Ionen mit niedriger Ladungsdichte nehmen eine kompaktere Struktur im Vergleich zu Ionen mit hoher Ladungsdichte, welche eine eher ausgedehnte Struktur annehmen, ein. Wird ein solches Ion niedriger Ladungsdichte einem Elektronentransferprozess unterzogen, können Spaltungen des Peptidgrates auftreten, jedoch werden die entstandenen c- und z $^{\bullet}$ -Fragmentionen, durch nonkovalente, intramolekulare Interaktionen in der kompakteren Struktur, zusammengehalten. Dieser Prozess, welcher vor allen Dingen bei zweifach geladenen Peptiden auftritt, wird als nichtdissoziative Elektronentransferdissoziation bezeichnet (ETnoD) und der entstehende Radikationenkomplex als intakte Spezies detektiert.¹⁹³ Dieses sogenannte ladungsreduzierte Precursorion ($[M + nH]^{(n-1)+\bullet}$) erlaubt keine Rückschlüsse auf die Sequenzinformation und kann somit auch nicht identifiziert werden.



Eine Möglichkeit, diese Limitierung zu umgehen, ist die Erhöhung der Ladungsdichte durch Derivatisierung des Peptides.¹⁹⁵⁻¹⁹⁷ Eine andere ist der Einsatz von ETD in Kombination mit CID, wobei ETD ausschließlich bei höheren Ladungszuständen und Precursorionen mit niedrigem m/z -Verhältnis eingesetzt wird und die kollisionsbasierten Techniken den Bereich der doppelt geladenen Precursorionen und höherer m/z -Werte abdecken. Diese sogenannten „decision-tree“ Methoden, bei der die am besten geeignete Fragmentierungstechnik für ein Precursorion ausgewählt wird, haben zu signifikanten Verbesserungen bei der Identifizierung von Peptiden geführt.¹⁹⁸⁻²⁰⁰

Weitere Strategien zur Aktivierung des nicht-dissoziativen ETD-Produkts umfassen eine erhöhte Temperatur oder den Einsatz zusätzlicher Aktivierung (*supplemental activation*, sa) mit Hilfe von Hybridaktivierungsmethoden.^{193, 201}

1.2.5.4 Elektronenbasierte Hybridaktivierungstechniken

Die zusätzliche Einführung von Energie mit Hilfe von Kollisionen oder Photonen ist eine weitere Möglichkeit, die Fragmentierungseffizienz von ETD zu erhöhen. Ziel dieser Verfahren ist es, insbesondere für Precursorionen niedriger Ladungszustände, die nichtkovalenten Wechselwirkungen des ETnoD-Prozesses aufzubrechen und eine größere Population an Produktionen zu generieren.

Zusätzliche Aktivierungen werden in der Regel nach dem ETD-Prozess eingesetzt. Verschiedene post-ETD Aktivierungsmethoden wurden entwickelt²⁰²⁻²⁰⁷, darunter die resonante CID-Anregung der ETnoD-Produkte, welche als ETciD bezeichnet wird.²⁰⁸ Eine aktuelle Entwicklung auf diesem Gebiet wurde von der Gruppe um Albert Heck eingeführt. Bei der sogenannten *electron transfer/higher energy collision dissociation* (EThcD) erfolgt eine Breitbandaktivierung aller ETD-Produkte mittels HCD.²⁰⁹ Im Gegensatz zur ETciD, welche hauptsächlich c/z-Ionen generiert, erzeugt die zusätzliche HCD „all ion fragmentation“ (AIF) sowohl c/z- als auch b/y-Ionen durch Anregung der ETnoD Produkte und des verbliebenen Precursorions. EThcD ist in der Lage, Serien komplementärer Fragmentionen zu erzeugen, welche die Sequenzabdeckung verbessern und die Sicherheit, mit der ein Peptid identifiziert wird, erhöhen.

Zu berücksichtigende Nachteile aller post-ETD Aktivierungsmethoden umfassen eine verstärkte Migration von Wasserstoffatomen zwischen den ETD-Produkten und die zusätzliche Zeit, die für die Aktivierung benötigt wird. Wasserstoffmigrationen können innerhalb des ETnoD-Komplexes, in dem c-Ionen mit gerader Anzahl an Elektronen und z[•]-Ionen mit ungerader Elektronenanzahl für einige Millisekunden nichtkovalente Wechselwirkungen eingehen, auftreten. So ist beispielsweise die Abstraktion eines Wasserstoffatoms von einem c-Ion durch ein z[•]-Radikal unter Bildung eines z⁺-Ions und einer c⁺-Spezies denkbar.^{208, 210-212} Kombinationen von c/z[•]-Ionen und c⁺/z⁺-Produktionen, welche sowohl bei ETciD als auch bei EThcD auftreten, erhöhen die Komplexität des Fragmentenspektrums und erschweren die manuelle und automatisierte Interpretation. Außerdem muss die zusätzliche Zeit, welche für die Aktivierung benötigt wird, berücksichtigt werden. Diese hängt von der Methode und den instrumentellen Aufbau ab und kann wie im Fall von EThcD 5-15 ms betragen.

Alle beschriebenen Fragmentierungstechniken sind erstmals standardmäßig mit der neuesten Generation von Orbitrapgeräten kommerziell erhältlich. Die Orbitrap Fusion™, ein Quadrupol-Orbitrap-Quadrupollinearionenfallen (q-OT-QLT) Tribrid Massenspektrometer, ermöglicht Fragmentierungen mittels CID, HCD, ETD, ETciD und EThcD und die Detektion von Fragmentionen innerhalb der Ionenfalle oder des Orbitrapmassenspektrometers (vgl. Abbildung 22).²¹³

Eine der bedeutendsten Neuerungen dieser Technologie ist die Einführung einer Flouranthenquelle im vorderen Bereich des Systems. Diese hat sich als robuster und benutzerfreundlicher als vorangegangene Techniken erwiesen. Darüber hinaus wurden standardisierte ETD-Reaktionen mit Hilfe von kalibrierten Reaktionszeiten eingeführt, welche Methodenentwicklungen und dessen Transfer auf andere Geräte vereinfacht.²¹⁴

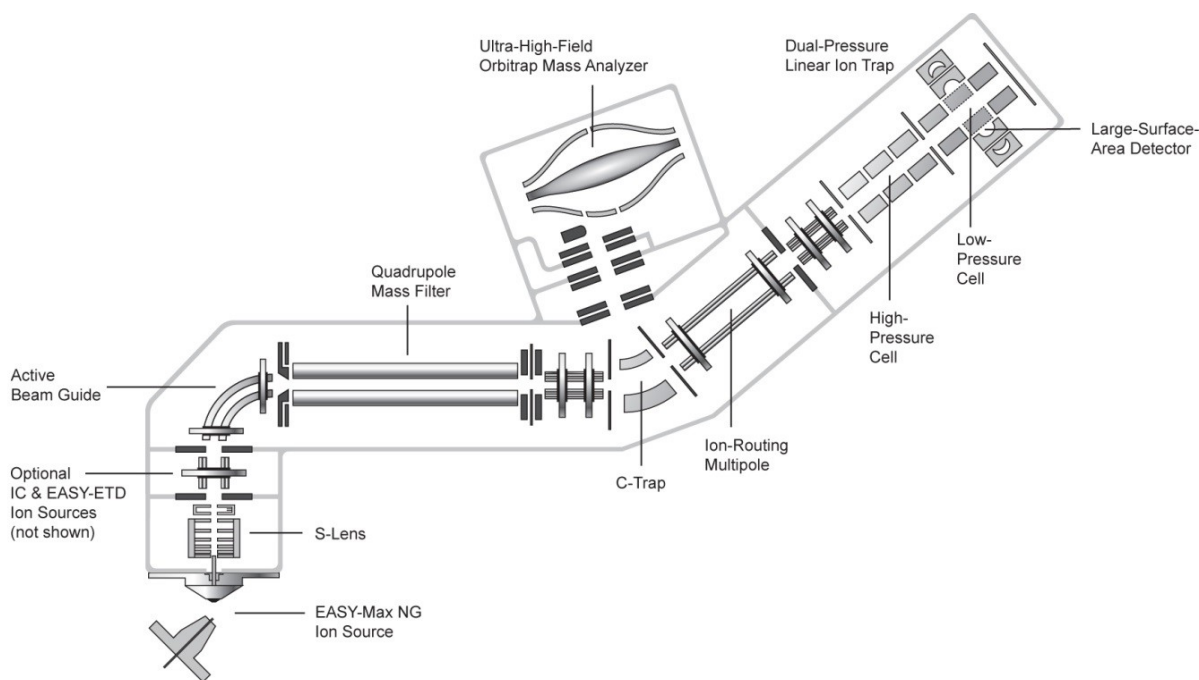


Abbildung 22: Schema des Aufbaus eines Orbitrap Fusion™ Tribridmassenspektrometers.²¹⁵

Um die beschriebenen Limitierungen, welche im Zusammenhang mit kollisionsbasierter zusätzlicher Aktivierung auftreten zu überwinden, wurde die Photoaktivierung als mögliche zusätzliche Aktivierung untersucht. Photoaktivierung kann sowohl vorher, während als auch nach dem ETD-Prozess angewandt werden. Die im Labor von J. J. Coon entwickelte „aktivierte Ionen ETD“ (AI-ETD) nutzt Infrarotphotoaktivierung zeitgleich mit dem ETD-Prozess, um nichtkovalente Interaktionen zu schwächen und das ETnoD-Produkt zu aktivieren. In folge dessen konnte der Anteil an sequenz-spezifischen Ionen signifikant erhöht werden. Darüber hinaus wird keine zusätzliche Zeit für den MS/MS-Scan benötigt und die Migration von Wasserstoffatomen, welche bei ETciD und EThcD zu beobachten ist, minimiert.²¹⁶⁻²¹⁸ Obwohl diese Form der zusätzlichen Aktivierung bemerkenswerte Ergebnisse zeigt, beschränkt sich deren Verbreitung bislang auf einige wenige Geräte-Prototypen und ist derzeit nicht kommerziell erhältlich. Weitere Informationen zu dieser vielversprechenden Technologie sind dem ausführlichen Übersichtsartikel von Riley *et al.* zu entnehmen.²⁰¹

1.2.5.5 Analyse von Phosphopeptiden mit elektronenbasierten Fragmentierungstechniken

Für die zweifelsfreie Lokalisierung von Protein- und Peptidmodifikationen müssen zwei wesentliche Voraussetzungen erfüllt sein: Die Tandem-MS-Technik muss eine weitgehende Fragmentierung des Peptid- oder Proteinrückgrates unter Erhalt der intakten Modifikation an dessen Aminosäurerestes gewährleisten. Wie in Kapitel 1.2.5.2 aufgegriffen, weisen kollisionsbasierte Fragmentierungstechniken, insbesondere in Bezug auf den zweiten Aspekt, Limitierungen auf. Im Gegensatz dazu ermöglichen elektronenbasierte Techniken die Fragmentierung des Peptidrückgrates unter Erhalt labiler Modi-

fikationen (vgl. Abbildung 23).^{183, 219-221} Dies hat zu zahlreichen Anwendungen von ETD bei der Analyse von PTMs wie Glykosylierungen, Ubiquitylierungen, ADP-Ribosylierungen und Argininmethylierungen geführt.²²²⁻²²⁹

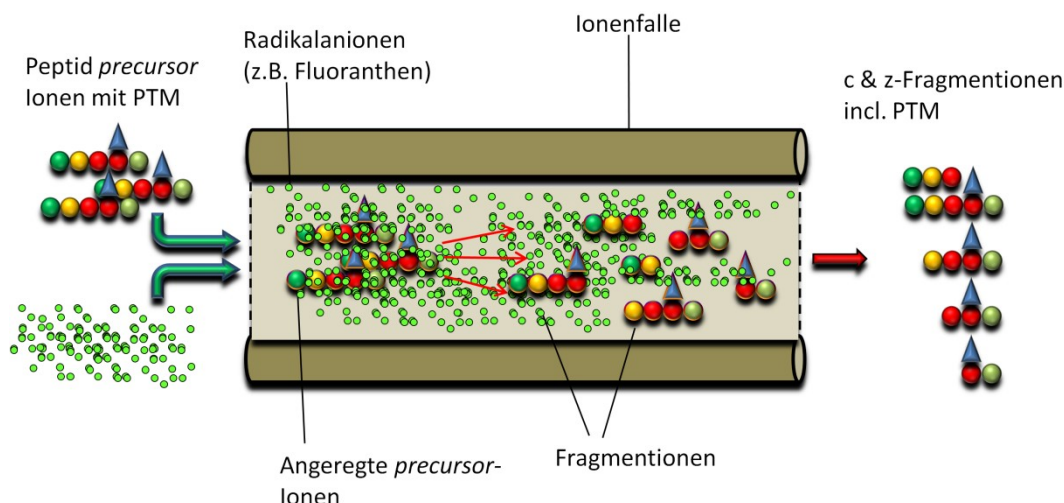


Abbildung 23: Schematische Darstellung der ETD eines modifizierten Peptides.

Peptid-Precursorionen werden gemeinsam mit Radikalanionen in einer Ionenfalle eingefangen. Durch Elektronentransfer erfolgt die Spaltung des Peptidrückgrates unter Erhalt der Modifikation. Die entstehenden c- und z[•]-Fragmenten tragen die Modifikation.

Ein entscheidender Grund für die Entwicklung elektronenbasierter Methoden war deren Einsatz in phosphoproteomischen Studien. Unter Berücksichtigung ihrer Nachteile (lange Zykluszeit, geringere Empfindlichkeit und geringe Fragmentierungseffizienz doppelt geladener Peptide) und Vorteile (hohe Fragmentierungseffizienz höher geladener Peptide unter Erhalt labiler Modifikationen) werden sie in unterschiedlichen Messmethoden erfolgreich eingesetzt. Neben den bereits beschriebenen „decision-tree-Methoden“, bei denen Sie in Kombination mit kollisionsbasierten Techniken eingesetzt werden und meist nur für die Fragmentierung höher geladener Precursorionen ($z \geq 3$) vorgesehen sind^{126, 230-232}, wurden komplexe „decision-tree-Algorithmen“ konzipiert, um ETD oder ECD gezielt zur Charakterisierung von Phosphopeptiden einzusetzen. In der Regel wird der unter CID-Bedingungen erzeugte Neutralverlust von Phosphorsäure (98 Da) genutzt, um ein zusätzliches ECD oder ETD-MS/MS-Experiment des gleichen Precursorions zu erzeugen.²³³⁻²³⁶ Die zunehmende Komplexität der generierten MS/MS-Daten wird begleitet von bioinformatischen Weiterentwicklungen, welche eine sinnvolle Einbindung von ETD-MS/MS-Spektren in etablierte Algorithmen ermöglichen. Die Aufnahme und Evaluierung von ETD-Spektren in eine umfangreiche Peptidbibliothek, bestehend aus synthetischen, phosphorylierten und unphosphorylierten Peptiden, hat diese Entwicklung zusätzlich unterstützt und unterstreicht die große Bedeutung der ETD bei der Klärung phosphoproteomischer Fragestellungen.²³⁷

Durch die Einführung der Hybridaktivierungstechniken EThcD und AI-ETD gelang ein weiterer wesentlicher Fortschritt für die ETD-basierte Analyse von Phosphopeptiden. Sie führten zu höheren Identifizierungsraten und Sequenzabdeckungen und haben die Fähigkeit, Phosphorylierungsstellen zweifelsfrei zu lokalisieren, entscheidend verbessert.^{217, 238}

Die Entwicklung der Hybridtechniken zog auch eine Weiterentwicklung der weitverbreiteten Suchmaschine im Bereich der Phosphoproteomik *phosphoRS* (oder später *ptmRS*) nach sich. Dieser Lokalisierungsalgorithmus nutzt Fragmentationen, um Wahrscheinlichkeiten von Phosphorylierungsstellen zu berechnen.⁸⁵

Da die ETD ideal dafür geeignet ist große mehrfach geladene Precursorkationen zu fragmentieren, ist sie die Methode der Wahl zur Analyse intakter, modifizierter Proteine und deren Isoformen in einem *top-down*-Ansatz. Auch auf diesem Gebiet zeigen die Hybridfragmentierungstechniken deutliche Vorteile gegenüber konventionellen ETD-MS/MS-Techniken.^{217, 239} So gelang mittels AI-ETD die Identifizierung von acht Phosphorylierungsstellen auf dem Milchprotein α -Casein (~23.5 kDa). Außerdem wurde mit Hilfe von EThcD die Übertragung von Phosphatgruppen innerhalb von Proteinkomplexen gezeigt. Aus den gewonnen Erkenntnissen ließen sich Bindungsstellen zwischen Phosphoproteinen und deren Bindungspartner ableiten.²⁴⁰

Abgesehen von den *O*-Phosphorylierungen konnte gezeigt werden, dass sich auch *N*-Phosphorylierungen von Lysin und Arginin mit Hilfe von ETD charakterisieren lassen. Während die labile Phosphoamidatbindung unter CID-Bedingungen erhebliche Neutralverluste zeigt und dies zu falschen Positionszuordnungen führen kann, sind Phosphoarginin und Phospholysin weitgehend stabil unter ECD und ETD-Bedingungen und lassen sich mit hoher Sicherheit identifizieren.^{60, 241-243} Allerdings gilt es, die Fragmentierungsbedingungen zu beachten. So konnte in der Gruppe von Eberhard Krause gezeigt werden, dass während der ETD-Fragmentierung von lysinphosphorylierten Peptiden ein Transfer der Phosphorylgruppe zu anderen Phosphoakzeptoren innerhalb des Peptides auftreten kann und somit die sichere Positionsbestimmung gefährdet ist. Der Ladungszustand und die Protonenmobilität sind wesentliche Faktoren, welche diese Migration beeinflussen.⁶⁹ Welche tragende Bedeutung der ETD bei der Klärung biologischer Fragestellungen zukommt, zeigt eine aktuelle Arbeit der Gruppe um Tim Clausen. In dieser wurden diverse Argininphosphorylierungen mittels ETD nachgewiesen und gezeigt, dass diese PTM eine entscheidende Rolle beim Proteinabbau- und Umsatz in dem grampositiven Bakterium *Bacillus subtilis* spielt.¹⁸

Die tandemmassenspektrometrische Untersuchung von *S*-Phosphorylierungen beschränkt sich bislang im Wesentlichen auf den Einsatz der CID, welche aufgrund von erheblichen Neutralverlusten nur bedingt für die zweifelsfreie Identifizierung von Cysteinphosphorylierungen geeignet ist.²⁴⁴ Inwieweit elektronenbasierte Fragmentierungstechniken diese Limitierung überwinden können, gilt es zu untersuchen.

Die Hybridfragmentierungstechnik EThcD hat bereits bei der proteomischen Analyse von *O*-Phosphorylierung für einen signifikanten Fortschritt gegenüber konventionellen ETD-Methoden gesorgt.²³⁸ Ob sich diese Verbesserungen auch auf das Gebiet der labilen *N*- und *S*-Phosphorylierungen oder weiterer, bislang unbekannter PTMs übertragen lassen, ist fraglich. Es wird unter anderem zu klären sein, inwieweit sich die zusätzliche HCD-Aktivierung auf die Stabilität dieser labilen Modifikationen auswirkt.

1.2.6 Ionenmobilität zur Trennung isobarer Peptide

Eine weitere Technologie, welche zunehmend für die Charakterisierung von Phosphopeptiden herangezogen wird, ist die sogenannte Ionenmobilitätsmassenspektrometrie (IM-MS). Mit Hilfe eines IM-MS-Experiments lassen sich Ionen anhand ihrer Masse, Größe, Form und Ladung voneinander trennen.^{245, 246} Dabei wird die Zeit gemessen, die Ionen benötigen, um durch eine Zelle, unter Einfluss eines schwachen elektrischen Feldes, zu driften. Während der Drift durch die mit einem inerten Gas (z.B. Helium oder Stickstoff) gefüllte Zelle, erfahren kompakte Strukturen eine geringere Anzahl an Stößen als elongierte und passieren somit die Zelle schneller. Dieses Prinzip ermöglicht es, Ionen aufgrund ihrer unterschiedlichen Konformation zu separieren und isobare, positionsisomere Phosphopeptide zu unterscheiden.^{247, 248} Darüber hinaus lässt sich die gemessene Driftzeit in eine geräteunabhängige Konstante, dem rotationsgemittelten Kollisionsquerschnitt (CCS), umrechnen. Der Bedarf an Probenmenge und Messzeit für ein IM-MS-Experiment ist vergleichbar mit einer herkömmlichen MS-Messung, sodass in einer LC-IM-MS-Analyse der Zugewinn dieser komplementären Trenntechnik ohne Kompromisse in Bezug auf die Schnelligkeit und die Empfindlichkeit der Messung erhalten wird.

In der Vergangenheit wurde die IM-MS in diversen phosphoproteomischen Studien erfolgreich bei der Trennung isomerer Phosphopeptide unter Erhöhung der Anzahl an identifizierten Phosphopeptiden eingesetzt.²⁴⁹⁻²⁵³ Verschiedene Studien konnten zeigen, dass Phosphorylierungen eine Verdichtung der Konformation nach sich ziehen und Phosphopeptide somit kleinere CCSs als ihre unmodifizierten Pendants aufweisen.^{251, 254} Darüber hinaus hat die IMS entscheidend zum Verständnis des Fragmentierungsverhaltens von Phosphopeptiden beigetragen.^{255, 256}

Nach der erfolgreichen Identifizierung phosphorylierter Peptide erfolgt im letzten Schritt deren Quantifizierung. Auch auf diesem Feld wurden in den vergangenen Jahren große Fortschritte erzielt, welche im Folgenden kurz zusammengefasst sind.

1.2.7 Quantifizierung in der Proteomik

Bei der Quantifizierung des Phosphoproteoms ist man jedoch vor besondere Herausforderungen gestellt: Zum einen leitet sich die quantitative Information nur aus einer begrenzten Anzahl an Peptiden pro Protein ab. Zum anderen können die Phosphorylierungsgrade verschiedener Phosphorylierungsstellen innerhalb eines Proteins variieren. Da man sich bei der Quantifizierung auf die Phosphopeptide beschränkt, ist außerdem die Probenmenge relativ gering.

Der Einsatz stabiler, isotoopenmarkierter Verbindungen ist ein Standardverfahren in der quantitativen Massenspektrometrie. In der Proteomik werden diese stabilen Isotope mit Hilfe von Zellkulturen oder durch chemisches Labeling eingeführt. Bei Methoden wie der stabilen Isotoopenmarkierung in Aminosäuren von Zellkulturen (SILAC), der aminomodifizierenden Markierungen (mTRAQ) und den Dimethylmarkierungen erfolgt die Quantifizierung auf der Ebene des MS¹-Spektrums.²⁵⁷⁻²⁵⁹

Das in der Gruppe von Matthias Mann entwickelte Verfahren SILAC basiert auf der Kultivierung zweier ursprünglich gleicher Zellkulturen mit unterschiedlichen Nährmedien.²⁵⁷ Eine der Zellkulturen enthält Aminosäuren, welche ein schweres Isotop tragen. Die Produkte der Proteinbiosynthese werden dadurch isotoopenmarkiert. Vereinigt man die Proteine beider Zellkulturen und verdaut diese, so unterscheiden sich die Peptide, welche eine isotoopenmarkierte Aminosäure enthalten, in ihren Massen. Vor dem Hintergrund, dass in proteomischen Studien meist Trypsin, welches C-terminal von Lysin und Arginin schneidet, verwendet wird, setzt man gewöhnlich ¹³C₆-Arginin, ²H₃-Lysin oder ¹³C₃-Lysin als modifizierte Aminosäure ein. Eine vollständige und selektive Spaltung vorausgesetzt, befinden sich die isotoopenmarkierten Aminosäurereste immer am C-Terminus des Peptides und man erhält einheitliche Massenverschiebungen von 6 Da für ¹²C/¹³C-Argininpeptidpaare bzw. 3 Da für ¹H/²H- oder ¹²C/¹³C-Lysinpeptidpaare. Anhand des MS¹ Signals beider Peptide lassen sich somit relative Quantifizierungen anstellen.

Ein entscheidender Vorteil dieses metabolischen Labelings ist, dass die unterschiedlich markierten Proteine zu einem sehr frühen Zeitpunkt gepoolt und gemeinsam prozessiert werden. Fehler, welche durch eine parallele Probenvorbereitung auftreten können, werden somit minimiert.¹⁰¹ Von Nachteil ist, dass aufgrund der hohen Kosten für die isotoopenmarkierten Aminosäuren sich der Einsatz von SILAC auf Zellkultursystem beschränkt und für umfangreiche *in vivo* Studien, die eine große Anzahl an Tieren umfassen, meist auf andere Verfahren zurückgegriffen wird.

Eine Weiterentwicklung dieses Verfahrens, die sogenannte SILAC Maus, ermöglichte es, das Tumorstwachstum in Hautkrebs anhand des Proteoms und Phosphoproteoms detailliert zu beschreiben.²⁶⁰ Die Entwicklung von super-SILAC, ein Verfahren bei dem isotoopenmarkierte Standards zugesetzt werden, bildet die Basis für phosphoproteomische Analysen primärer Säugerzellen. Mit Hilfe dieses Ansatzes wurde die Reaktion von Mäuseleberzellen auf die Behandlung mit Insulin anhand von 10.000 Phosphorylierungsstellen quantitativ untersucht.²⁶¹

Die Quantifizierung von Phosphopeptiden muss sich nicht auf das Übersichtsspektrum, dessen inhärente Komplexität die Probentiefe limitieren kann, beschränken. Diverse MS²-Quantifizierungsstrate-

gien haben sich als sinnvolle Alternativen etabliert. Im Allgemeinen nutzen diese Methoden isobare Markierungen wie zum Beispiel die Tandem-Massenmarkierungen (TMT) und die isobaren Markierungen für relative und absolute Quantifizierung (iTRAQ).^{104, 105, 262} Diese Methoden ermöglichen die gleichzeitige Untersuchung von bis zu zehn Zuständen innerhalb eines Experiments.^{159, 263}

Bei der weit verbreiteten TMT-Methode werden Markierungen eingesetzt, die sich aus einem NHS-Ester (Bindung an das Peptid), einem Massennormalisierungsbereich, einem MS/MS-spaltbaren Linker und einem Reporterabschnitt zusammensetzen (vgl. Abbildung 24).

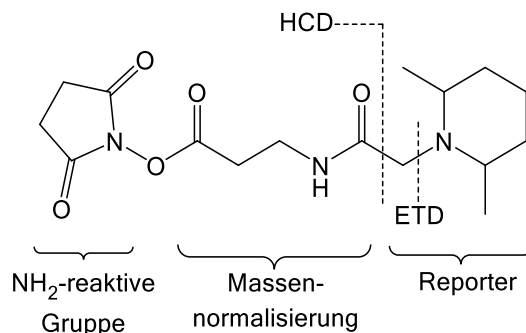


Abbildung 24. Struktur einer Tandem-Massenmarkierung (tandem mass tags, TMT).

Die einzelnen Label sind chemisch identisch, jedoch besitzen die Reporterabschnitte unterschiedliche Isotope. Diese werden durch den Massennormalisierungsbereich ausgeglichen, sodass in der Summe alle Markierungen isobar (nominelle Masse) zueinander sind. Da die verschiedenen Markierungen die gleiche Masse und Struktur aufweisen, sind Peptide, welche mit verschiedenen Labeln markiert wurden, nicht chromatographisch und auf der Ebene des MS^1 zu unterscheiden. Erst durch Tandemmassenspektrometrie werden die Reporterionen unterschiedlicher Masse freigesetzt. Die entsprechenden MS/MS-Spektren enthalten sowohl die Information über die Peptidsequenz als auch das Reporterion, dessen relative Intensität für die Quantifizierung herangezogen wird.

Eine entscheidende Limitierung dieser isobaren Markierungsstrategien besteht in der gleichzeitigen Fragmentierung von Peptiden, welche sich im gleichen Isolationsfenster befinden.²⁶⁴ Dies kann zu veränderten Verhältnissen unter Reporterionen führen und die Genauigkeit der Quantifizierung beeinträchtigen. Die Einführung MS^3 -basierter Methoden und die Reduktion des Ladungszustandes mittels Protonentransfer konnten das Problem der Precursorinterferenz reduzieren.^{106, 264} Die neueste Generation von MS/MS Quantifizierungsstrategien greift dieses Prinzip auf. Bei der sogenannten synchronen Precursorselektion (SPS) wird eine gleichzeitige CID-Fragmentierung verschiedener Produktionen durchgeführt. Dies führt zu einer Verzehnfachung der für die Quantifizierung relevanten Reporterionen gegenüber der herkömmlichen MS^3 -Methode. Ein größerer dynamischer Bereich und geringere Abweichungen bei den Signalintensitäten der Reporterionen ermöglichen somit genauere Quantifizierungen von Phosphopeptiden.²⁶⁵ Es gilt jedoch zu berücksichtigen, dass die technologischen Voraussetzungen für diese Quantifizierungsstrategie nur mit Tribridmassenspektrometern gegeben sind.²¹³

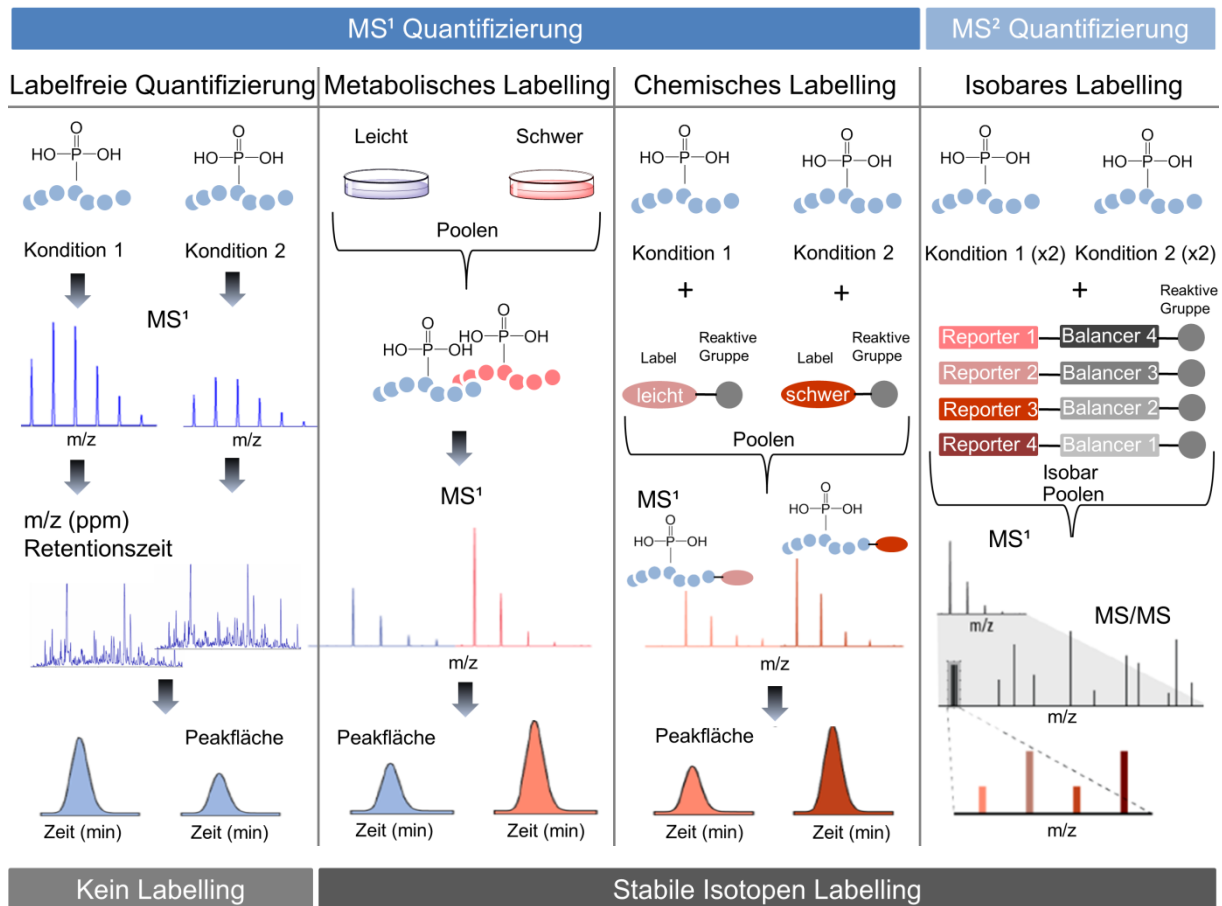


Abbildung 25: Strategien zur Quantifizierung des Phosphoproteoms.²⁶⁶

Quantifizierungen auf MS¹-Level unter Berücksichtigung der Fläche unter dem Elutionspeak ermöglichen eine präzise Bestimmung von Phosphopeptiden. Bei der labelfreien Quantifizierung werden verschiedene Zustände ohne zusätzliche Arbeitsschritte nacheinander gemessen. Für die Quantifizierung werden die Retentionszeit und die hochaufgelöste Masse herangezogen, um Phosphopeptide unterschiedlicher LC-MS/MS-Läufe miteinander zu vergleichen. Im Gegensatz dazu erlauben stabile isotopenbasierte Techniken die parallele Erfassung verschiedener Zustände innerhalb eines LC-MS/MS-Laufes. Beim metabolischen Labeling (bspw. SILAC) werden stabile Isotope während der Zellkultivierung eingebaut. Phosphopeptide, welche aus verschiedenen Zuständen stammen, unterscheiden sich demzufolge in ihren Massen, was sich durch Massenunterschiede im MS¹ nachvollziehen lässt. Die Flächen unter dem Elutionspeak des leichten und des schweren markierten Phosphopeptides werden für die Quantifizierung ins Verhältnis gesetzt. Das chemische Labeling (bspw. Dimethyl-Methode oder mTRAQ) nutzt ebenfalls das Elutionsprofil des Übersichtsspektrums. In diesem Fall wird die Markierung durch eine chemische Reaktion mit funktionellen Gruppen (z.B. primäre Amine) erreicht. Bei dem isobaren Labeling (z.B. TMT) werden die Peptide ebenfalls an funktionellen Gruppen markiert. Die Quantifizierung erfolgt jedoch auf Ebene des MS². Die intakte Masse jeder Markierung ist exakt gleich. Sie setzt sich aus der variierenden Masse eines Reporterabschnitts und einem ausgleichenden Balancerabschnitt zusammen. Während der Fragmentierung werden mehrere Reporterionen gleichzeitig freigesetzt und ihre relativen Signalintensitäten innerhalb eines Scan für die Quantifizierung herangezogen.

Neben den beschriebenen Strategien erfahren labelfreie Quantifizierungsmethoden eine immer größere Akzeptanz in der phosphoproteomischen Community.^{108, 109, 267} Sie ermöglichen den Vergleich zwischen verschiedenen Proben ohne den Einsatz von Isotopenmarkierungen. In einem labelfreien Ansatz werden die einzelnen Bedingungen nicht miteinander gemischt, sondern jede Probe einzeln vermessen. Dies hat den Vorteil, dass theoretisch eine unbegrenzte Anzahl an Bedingungen und Replikaten erfasst werden können. Außerdem ermöglicht die relativ einfache Methodik die Einbindung verschiedener Anreicherungs- und Fraktionierungsverfahren. Da keine zusätzlichen Arbeitsschritte von Nöten sind, lassen sich labelfreie Strategien ideal in Hochdurchsatzverfahren und automatisierte Probenvorbereitungen einbinden und könnten somit ein wichtiges Werkzeug in der klinischen Diagnostik darstellen. Bei all den genannten Vorteilen gilt es jedoch zu berücksichtigen, dass labelfreie Strategien aufgrund des nicht vorhandenen Multiplexing einen deutlich höheren Messaufwand beanspruchen als Verfahren wie SILAC oder TMT.

Die vorangegangenen Methoden dienen ausschließlich der relativen Quantifizierung. Die in der Gruppe von Prof. Linscheid entwickelten *metal-coded affinity tags* (MeCAT) erlauben zusätzlich eine absolute Quantifizierung von Proteinen sowie Peptiden und wurden bereits erfolgreich bei der Charakterisierung von Proteomen eingesetzt.²⁶⁸ Dazu werden die Analyte an Cysteinresten mit macrocyclischen Chelatkomplexen, die mit verschiedenen Lanthanoidmetallionen beladen sind, gelabelt. Die anschließende massenspektrometrische Analyse mittels induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS) ermöglicht Nachweisgrenzen im Attomolbereich und gewährleistet einen großen linearen Bereich.²⁶⁹

1.2.8 Bioinformatische Auswertung phosphoproteomischer Experimente

Die während eines phosphoproteomischen Ansatzes anfallende, enorme Anzahl an Fragmentspektren und deren z.T. inhärente Komplexität, lässt sich manuell nicht mit vertretbarem Aufwand auswerten. Um die Peptidsequenz und die Zuordnung der Phosphorylierungsstelle tausender Phosphopeptide zu ermöglichen, wurden daher diverse Suchmaschinen entwickelt. Eigens dafür wurden umfangreiche Bibliotheken synthetisierter Phosphopeptide angelegt. Die daraus gewonnenen Fragmentspektren boten eine ideale Grundlage zur Evaluierung etablierter Suchalgorithmen und waren die Basis für die Entwicklung neuer bioinformatischer Werkzeuge.²³⁷ Eine weit verbreitete Suchmaschine zur Bestimmung von Phosphorylierungsstellen ist *phosphoRS* oder dessen Weiterentwicklung *ptmRS*.⁸⁵ *PhosphoRS* ist in der Lage die Daten resultierend aus unterschiedlichen Fragmentierungstechniken und verschiedener Massengenauigkeit auszuwerten. Als Parameter für die Zuordnung einzelner Phosphorylierungsstellen werden individuelle Phosphorylierungspositionswahrscheinlichkeiten angegeben. Im Vergleich zu bestehenden Algorithmen wie dem A-Score²⁷⁰ (3107 Phosphorylierungsstellen) und dem Mascot Delta Score⁸⁹ (2763 Phosphorylierungsstellen) konnten somit eine erhöhte Anzahl (3470) an Phosphorylierungsstellen eindeutig nachgewiesen werden.

2 Zielstellung

Die fundamentale Bedeutung von Proteinphosphorylierungen hat die Entwicklung spezifischer Anreicherungsverfahren, chromatographischer Trenntechniken, zuverlässiger Quantifizierungsmethoden, effizienter bioinformatischer Werkzeuge und nicht zuletzt immer leistungsfähigerer massenspektrometrischer Verfahren vorangetrieben. Diese Entwicklung eröffnete die Möglichkeit, Veränderungen in komplexen Phosphoproteomen, durch Identifizierung und relativer Quantifizierung von zehntausenden von Phosphorylierungsereignissen, zu studieren. Dies gilt im Wesentlichen für Proteinphosphorylierungen an den Seitenketten von Serin, Threonin und Tyrosin. Für bisher weniger im Fokus stehende N- und S-Proteinphosphorylierungen sowie Pyrophosphorylierungen weisen die etablierten Standardmethoden der Phosphoproteomanalyse allerdings diverse Limitierungen auf.

Um diesen Mangel an adäquaten Methoden zu überwinden, sollten im ersten Schritt dieser Arbeit tandemmassenspektrometrische Techniken miteinander verglichen und Strategien entwickelt werden, welche eine zuverlässige Charakterisierung dieser labilen Peptid- und Proteinmodifikationen ermöglichen. Dies sollte zum einen unter dem Gesichtspunkt der Stabilität der Modifikation unter verschiedenen MS/MS-Verfahren erfolgen und zum anderen mit Hilfe von gebräuchlichen Suchalgorithmen evaluiert werden.

Ein weiteres wichtiges Ziel im Rahmen dieser Arbeit bestand darin, mit Hilfe dieser optimierten Fragmentierungstechniken und verschiedener *bottom-up*-Ansätze eine endogene Cysteinphosphorylierung zweifelsfrei nachzuweisen.

Im darauf folgenden Schritt sollten die gesammelten Kenntnisse dazu genutzt werden, um synthetisch bereit gestellte Proteinmodifikationen zu charakterisieren und mögliche Nebenreaktionen zu identifizieren. Außerdem sollten massenspektrometrische Methoden entwickelt werden, welche die Analyse der Proteine in ihrer intakten Form ermöglichen und Rückschlüsse auf den generellen Modifizierungsgrad zulassen.

Ferner sollten Grundlagen für die Identifizierung möglicher Lysinphosphorylierungen auf dem Histon H1 gelegt werden. Für die proteomweite Suche nach labilen Proteinphosphorylierungen mit dem Fokus der Lysinphosphorylierung sollte ein geschlossener Proteomikansatz, bestehend aus einem leistungsfähigen Anreicherungsverfahren, einer adäquaten Fraktionierungstechnik und einer selektiven LC-MS/MS-Methode etabliert werden.

Außerdem war es Ziel dieser Arbeit eine massenspektrometrische Methode für die Identifizierung von pyrophosphorylierten Peptiden zu entwickeln. Basierend auf dieser Strategie sollten im Anschluss in Kombination mit einem pyrophosphopeptidspezifischen Anreicherungsverfahren und verschiedener Fraktionierungstechniken die ersten endogenen Proteinpyrophosphorylierungen in Hefezellen und menschlichen embryonalen Nierenzellen nachgewiesen werden.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Tandem-MS von cysteinphosphorylierten Peptiden

Während umfangreiche phosphoproteomische Studien von *O*-Phosphorylierungen deren herausragende Rolle in der Regulation essentieller zellulärer Prozesse demonstriert haben, ist bislang wenig über die biologische Funktion der Cysteinphosphorylierung bekannt. Neben der geringen natürlichen Häufigkeit von Cysteinresten besteht ein wesentlicher Grund in dem Mangel an adäquaten massenspektrometrischen Methoden zur Analyse dieser PTM (vgl. Kapitel 1.2.5.5). Um diese Limitierung überwinden und Techniken entwickeln zu können, wurde von Bertran *et al.* eine chemoselektive Synthese zur Darstellung von cysteinphosphorylierten Peptiden entwickelt.⁶¹ Auf Basis dieser wurde im Labor von Prof. Hackenberger eine Auswahl von pCys-Peptiden, welche zum Teil endogene Cysteinphosphorylierungen repräsentierten, synthetisiert und deren tandemmassenspektrometrisches Verhalten untersucht.

3.1.1 CID-Fragmentierung cysteinphosphorylierter Peptide

Um die Limitierungen der weit verbreiteten CID zu demonstrieren, wurden zuerst pCys-Peptide mit dieser Technik fragmentiert. In Abbildung 26 ist ein typisches CID-MS/MS Spektrum dargestellt. Es zeigt die Fragmentierung des doppelt protonierten Peptides EQLpCFSLYNAQR, ein tryptisches Peptid, welches aus dem Regulatorprotein MgrA stammt.²²

Das Fragmentspektrum ist dominiert von Signalen, die aus Neutralverlusten ausgehend von dem Precursorion stammen. Neben den Neutralverlusten von 80 Da (HPO_3) und 98 Da (H_3PO_4 ; Basepeak) finden sich weitere Neutralverluste von Wasser (18 Da). Darüber hinaus weist das Spektrum zahlreiche Fragmente, welche aus der Spaltung des Peptidrückrates stammen, auf. Diese haben ebenfalls die Phosphorylierung verloren, sodass eine Identifizierung der Aminosäuresequenz möglich ist, die Lokalisierung der Phosphorylierungsstelle jedoch nicht gelingt. In dem konkreten Beispiel ist eine Differenzierung zwischen der korrekten Phosphorylierung an Position Cys-4 und einer falschen Zuordnung an Position Ser-6 nicht gegeben. Dieses Beispiel untermauert, dass Cysteinphosphorylierungen zusätzlich zu ihrer inhärenten Säurelabilität instabil gegenüber kollisions-induzierten Prozessen in der Gasphase sind.

In der Vergangenheit wurden Neutralverlustmuster für die Identifizierung labiler Phosphorylierungen herangezogen. So wurde von der Gruppe um Tom Muir proklamiert, dass Neutralverluste von 80, 98 & 116 Da ein Indikator für Histidinphosphorylierungen sein.²⁷¹ Das aufgeführte Beispiel verdeut-

licht, dass sich derartige Neutralverluste nicht auf Histidinphosphorylierungen beschränken und man kann davon ausgehen, dass auch andere *N*-Phosphorylierungen ein derartiges Neutralverlustmuster erzeugen.

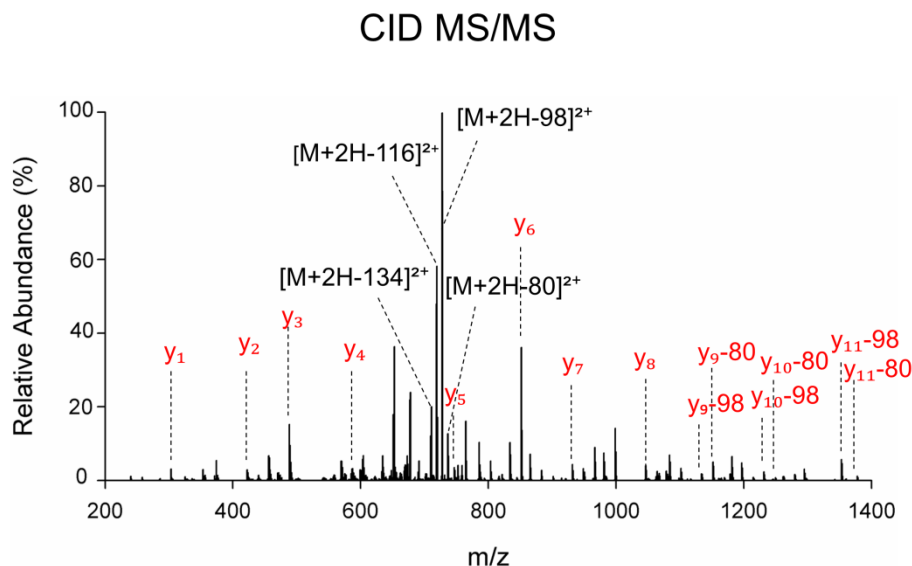


Abbildung 26: CID Fragmentspektrum des Precursorions des pCys-Peptides EQLpCFSLYNAQR.

Das Spektrum weist hochabundante Signale auf, welche aus Neutralverlusten (80, 98, 116 & 134 Da) ausgehend von dem Precursorion stammen. Diagnostische Fragmentationen zur Lokalisierung der Modifikation fehlen. Exemplarisch dafür sind die Fragmentationen der lückenlosen *y*-Serie hervorgehoben.

Inwieweit dieses Triplet charakteristisch für *N*- und *S*-Phosphorylierungen ist, gilt es zu untersuchen. Insbesondere der Neutralverlust von 80 Da könnte ein indikatives Signal für ein labil phosphoryliertes Peptid sein und dessen Erkennung ein nützliches Werkzeug bei der Identifizierung endogener Cysteinphosphorylierungen darstellen. Vor diesem Hintergrund wurde der Einfluss der normalisierten Kollisionsenergie (*normalized collision energy*, NCE) auf die relative Abundanz dieses Neutralverlustes untersucht. Es wurde deutlich, dass eine schrittweise Reduktion der herkömmlichen Fragmentierungsenergie von 35 auf 25% einen Einfluss auf die relativen Intensitäten des Neutralmusters hat. Während der Neutralverlust von 80 Da kontinuierlich zunahm, wurde ein Rückgang der Intensität für die Neutralverluste von 98 und 116 Da festgestellt. Außerdem nahm die Intensität der Signale, welche aus Fragmentierungen des Peptidrückgrates stammten, ab (vgl. Abbildung 27).

Allgemein konnte das Tripletmuster (80, 98 & 116 Da) für alle untersuchten pCys-Peptide unter CID-Bedingungen nachgewiesen werden. Als einziges Kriterium für den Nachweis einer Cysteinphosphorylierungen kann dies jedoch nicht herangezogen werden, da davon auszugehen ist, dass neben pHis auch pLys und pArg vergleichbare Neutralverlustmuster erzeugen, sodass nach zuverlässigeren Alternativen gesucht werden musste.

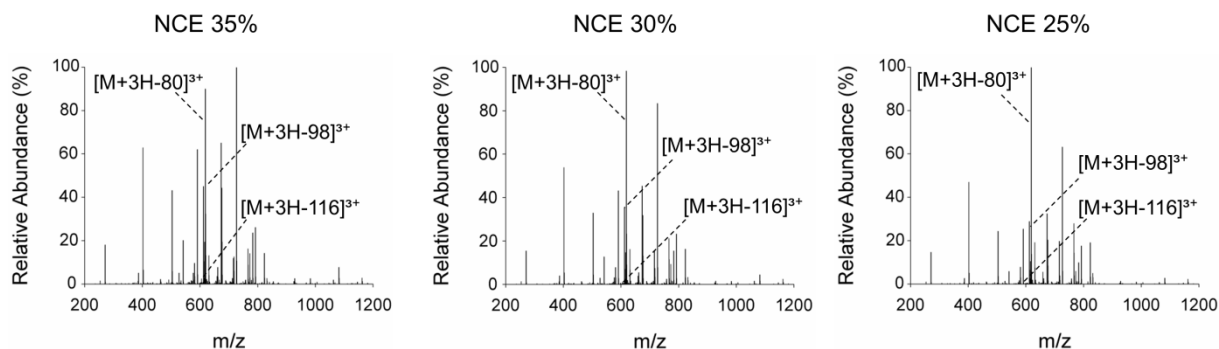


Abbildung 27: Einfluss der normalisierten Kollisionsenergie (NCE) auf die Neutralverluste 80, 98 & 116 Da am Beispiel des Peptides IGIHSGSpCVAGVVGLTMPR.

3.1.2 HCD-Fragmentierung cysteinphosphorylierter Peptide

Aufgrund ihres effizienteren Fragmentierungsverhaltens in Kombination mit hochauflösender Detektion und damit verbunden höheren Identifizierungsraten hat die HCD-Fragmentierung die CID in weiten Teilen der Phosphoproteomik ersetzt. Darüber hinaus hat sie ihr Potential, labile Phosphorylierungen identifizieren zu können bereits mehrfach demonstriert. Vor allem die Generierung sogenannter Phosphoimmoniumionen (z. B. bei pHis) kann als eindeutiger Beweis genutzt werden.^{26, 136}

Ein vergleichbares Fragment wurde für cysteinphosphorylierte Peptide allerdings nicht gefunden. Im Gegenteil, unabhängig von der angewandten CE gelang bei den untersuchten pCys-Peptiden nicht der Nachweis eines Fragments, welches die Phosphorylierung trug. Exemplarisch dafür ist in Abbildung 28 das HCD-Spektrum des Peptides EQLpCFSLYNAQR dargestellt.

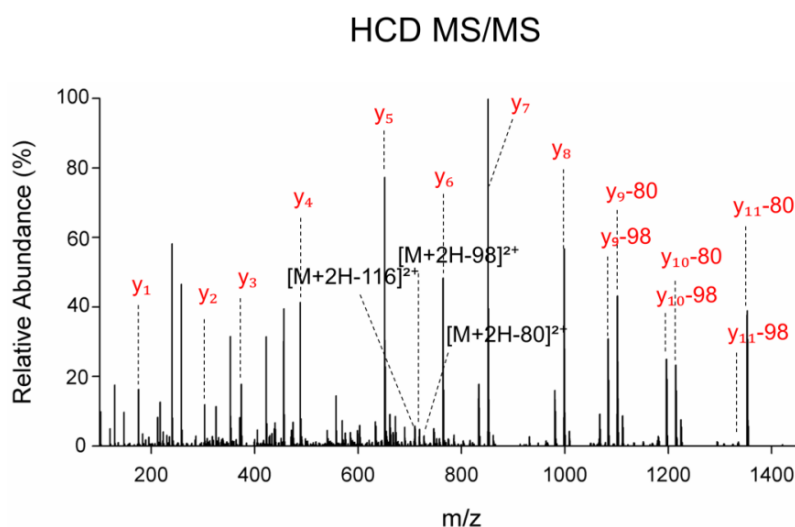


Abbildung 28: HCD-Fragmentspektrum des doppelt protonierten, cysteinphosphorylierten Peptides EQLpCFSLYNAQR.

Das HCD-Spektrum weist eine lückenlose Sequenzabdeckung auf, wobei insbesondere die Fragmente der y-Serie dazu beitragen. Im Vergleich zur CID zeigt sich eine erheblich stärkere Fragmentierung des Peptidrückrates, diagnostische Fragmentationen wie zum Beispiel y_9 oder y_{10} fehlen jedoch. Ferner ist das Tripletneutralverlustmuster (80, 98 & 116 Da) in deutlich geringeren Intensitäten im Vergleich zur CID wiederzufinden. Es ist zwar nicht auszuschließen, dass auch unter HCD-Bedingungen gelegentlich phosphatrestetragende Fragmente auftreten, eine sichere Identifizierung von Cysteinphosphorylierungen lässt sich anhand dieses Fragmentierungsverhaltens jedoch nicht garantieren.

3.1.3 EThcD-Fragmentierung cysteinphosphorylierter Peptide

Elektronenbasierte Fragmentierungstechniken haben sich in der Vergangenheit als nützliche Alternativen zu den CID-Techniken erwiesen. Inwieweit sich dies auf die Hybridaktivierungstechnik EThcD übertragen lässt und ob die Cysteinphosphorylierung stabil gegenüber der zusätzlichen HCD-Aktivierung ist, galt es zu klären. Dazu wurden EThcD-Spektren mit einer ladungsabhängigen ETD-Reaktionszeit und verschiedenen zusätzlichen Aktivierungsenergien aufgezeichnet. Die im Zuge der Optimierung der Fragmentierungsbedingungen erzielten Ergebnisse erfüllten in vollem Umfang die Anforderungen an eine sichere Lokalisierung von Cysteinphosphorylierungen.

Beispielhaft dafür sei kurz auf das EThcD-Spektrum des Peptides EQLpCFSLYNAQR eingegangen (vgl. Abbildung 29).

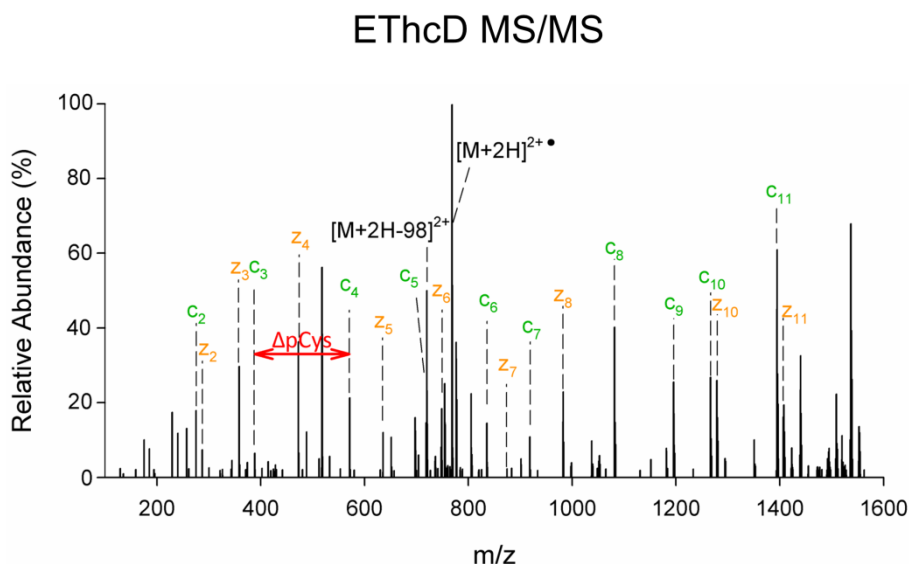


Abbildung 29: EThcD-Fragmentspektrum des dreifach geladenen Precursorions des pCys-Peptides EQLpCFSLYNAQR.

Das Spektrum weist eine lückenlose Sequenzabdeckung unter Erhalt der labilen Cysteinphosphorylierung auf.

Die erzeugten c- und z-Ionen gewährleiten eine lückenlose Sequenzabdeckung des Peptides, ohne eine signifikante Abspaltung der labilen Modifikation. Die geschlossene c-Serie enthält die diagnostischen Fragmente c_3 (unphosphoryliert) und c_4 (phosphoryliert), aus deren Differenz sich die Phosphorylierungsstelle einfach und zweifelsfrei ableiten lässt. Fragmente, die eine Migration des Phosphatrestes beispielsweise an die Position Ser-6 indizieren würden, konnten nicht nachgewiesen werden. Typischerweise zeigt das Spektrum ein hochabundantes Signal, welches dem ladungsreduzierten Precursorion entspricht. Diese Spezies wird gebildet, sobald auf das positiv geladene Precursorion ein Elektron übertragen wird, es jedoch zu keiner Fragmentierung kommt. Ausgehend von diesem ladungsreduzierten Ion finden sich oftmals Neutralverluste von 80 Da und 98 Da. All diese Bestandteile des MS^2 haben einen geringen Informationsgehalt und es gilt diese zu reduzieren.

ETHcD-Spektren von Precursorionen mit einem Ladungszustand $z > 2$ weisen idealerweise Fragmentationen auf, welches aus Spaltungen des Peptidrückrates stammen und deren relative Abundanzen über den gesamten m/z -Bereich des Spektrums vergleichbar hoch sind oder eine Tendenz zum Anstieg der relativen Abundanz bei größerem m/z -Verhältnis aufweisen. Sind diese Kriterien erfüllt, so lag ausreichend ETD-Reagenz vor und es bestand genügend Zeit für den ETD-Prozess. Weist das Spektrum hingegen hochabundante Fragmente mit niedrigen m/z -Verhältnissen und einen hohen Anteil an verschiedenen Neutralverlusten auf, war der Einfluss der zusätzlichen HCD-Aktivierung zu groß und keine idealen ETD-Bedingungen gegeben. Darüber hinaus ist die Überwachung der Intensität des Precursorions innerhalb des MS^2 kein adäquater Indikator für die Beurteilung der Qualität des ETHcD-Spektrums, da dieser im Zuge der zusätzlichen Aktivierung in aller Regel fragmentiert wird. Werden diese Kriterien berücksichtigt, so ist eine zuverlässige Fragmentierung auch großer Peptide problemlos möglich und eine sichere Erkennung von Cysteinphosphorylierungen gewährleistet. Des Weiteren lässt sich bereits an dieser Stelle vorwegnehmen, dass unter Beachtung der aufgeführten Charakteristika die Identifizierung weiterer labiler Modifikationen realistisch ist.

Nach den allgemein zufriedenstellenden Ergebnissen der ETHcD-Fragmentierung von synthetischen pCys-Peptiden, wurde im nächsten Schritt dazu übergegangen, die gewonnenen Erkenntnisse anzuwenden und gezielt eine endogene Cysteinphosphorylierung nachzuweisen.

3.1.4 Charakterisierung einer endogenen Cysteinphosphorylierung

Als Modellsystem wurde von Dr. Bertran die cytosolische IIB^{Glc} Domäne der Transmembranuntereinheit des Glukosespezifischen Transporters IICB^{Glc} von *E. coli* gewählt. IICB^{Glc} ist ein Teil des phosphoenolpyruvat (PEP)-abhängigen Phosphotransferasesystems (PTS) und vermittelt die Aufnahme und gleichzeitige Phosphorylierung von Glukose.²⁷² In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass Glukose phosphoryliert wird, nachdem der Phosphatrest von PEP über eine Kaskade bestehend aus

drei pHis-Intermediaten (EI, HPr, IIA^{Glc}) und dem pCys-Intermediat IIB^{Glc} transferiert wurde (vgl. Abbildung 30a). Belegt wurde die Cysteinphosphorylierung anhand von NMR-Messungen, Labelingstrategien und Stabilitätsstudien.^{31, 273, 274} *Bottom-up*-Studien von IIB^{Glc} wurden ebenfalls durchgeführt. Eine zweifelsfreie Bestimmung der Phosphorylierungsstelle anhand des aufgezeichneten CID-Spektrums war jedoch schwierig, da die relevanten Fragmentionen der y-Serie überwiegend einen Neutralverlust von 80 Da aufwiesen.²⁴⁴ Es galt nun zu zeigen, dass EThcD in der Lage war, diese Limitierung zu überwinden.

Dazu wurden die vier für den Phosphorylierungsprozess relevanten Untereinheiten (EI, HPr, IIA^{Glc} und IIB^{Glc}) überexprimiert. Ohne die Proteine zuvor aufgereinigt zu haben, wurde die *in vitro* Phosphorylierung durch Zugabe eines Überschusses an PEP zu einem Zelllysats induziert. Danach wurden zwei unterschiedliche *bottom-up*-Ansätze verfolgt: Zum einen wurde das Proteingemisch mittels SDS-PAGE getrennt, einzelne Gelbanden ausgeschnitten und ein In-Gelverdau mit Trypsin vorgenommen. Zum anderen wurde ein Lösungsverdau vorgenommen und das Peptidgemisch in einem 2D-RPLC-RPLC-Ansatz analysiert (vgl. Abbildung 30 b & c).

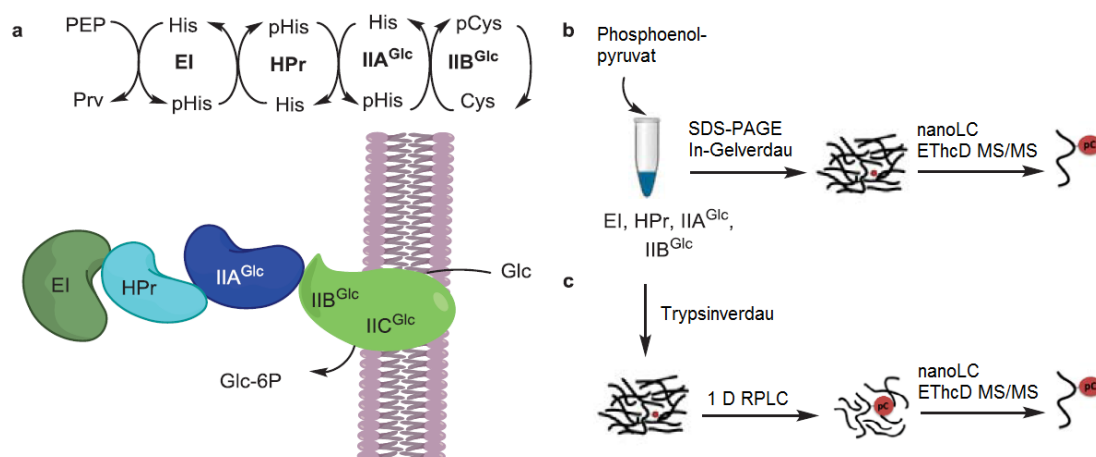


Abbildung 30: Workflow der Identifizierung einer endogenen Cysteinphosphorylierung.⁶¹

(a) Glukosespezifisches phosphoenolpyruvat-abhängiges Phosphotransferasesystem. Die Phosphatgruppe wird vom PEP sequentiell zur IIB^{Glc} Domäne des Transmembranproteins IICB^{Glc} transportiert. (b) SDS-PAGE In-Gelverdau Proteomikansatz. (c) In Lösungsverdau und anschließender 2D-RPLC-RPLC-MS/MS-Ansatz.

Die erhaltenen Proben wurden mit nanoLC-ESI-EThcD-MS/MS analysiert. Um eine höchstmögliche Empfindlichkeit zu erzielen, wurde ein fokussierter Ansatz, bei dem sich auf wenige relevante Peptide konzentriert wurde, gewählt. Von Bedeutung waren dabei das phosphorylierte und das unmodifizierte Peptid, sowie Varianten mit einer Fehlsplattstelle und einer weiteren Cysteinmodifikation, die im Zuge der Probenvorbereitung auftreten kann. Die verschiedenen Peptide wurde in einer sogenannten Einbeziehungsliste (*inclusion list*) zusammengefasst (vgl. Tabelle 1).

Tabelle 1: Einziehungsliste des fokussierten Ansatzes zur Identifizierung eines endogenen pCys-Peptides.

Masse	Ladungszustände	Peptidsequenz
1361.6609	2-3	ENITNLDACITR
1418.6824	2-3	ENITNLDAcamCITR
1441.6272	2-3	ENITNLDApCITR
1630.8461	2-3	ENITNLDACITRLR
1710.8124	2-3	ENITNLDApCITRLR
3021.4900	2-3	ATGTSEMAPALVAAFGGKENITNLDACITR
3101.4563	2-3	ATGTSEMAPALVAAFGGKENITNLDApCITR

Dazu wurde das Übersichtsspektrum mit hoher Auflösung ($R=120.000$) und Massengenauigkeit (≈ 1 ppm) gemessen. Sobald ein entsprechendes doppelt oder dreifach geladenes Precursorion innerhalb eines Massenfehlers von 10 ppm im MS^1 auftrat, wurde dieses mit dem Quadrupol selektiert und mittels EThcD und HCD fragmentiert. Da sich auf sehr wenige selektierte Precursorionen konzentriert wurde, war es möglich, einen niedrigen Schwellwert sowie lange Injektionszeiten und hohe AGC-Targetwerte zu wählen. Außerdem waren die einzelnen *scans* in Relation zur Breite des chromatographischen Peaks kurz, sodass sich für einen Peak diverse Tandem-MS-Experimente durchführen ließen. Dies wiederum bot die Möglichkeit, ideale Fragmentierungsbedingungen für die relevanten Zielionen zu schaffen. Sowohl das cysteinphosphorylierte Peptid ENITNLDApCITR als auch sein unphosphorylierter Counterpart wurden somit identifiziert. Das dazugehörige MS/MS-Spektrum des endogenen pCys-Peptides weist eine lückenlose Sequenzabdeckung auf und erlaubte die eindeutige Lokalisierung der Phosphorylierungsstelle. Hervorzuheben sind die hohen relativen Abundanzen der Fragmentionen von zum Teil über 50%, ein Verhalten, welches von der herkömmlichen ETD-Fragmentierung nicht bekannt ist. Außerdem waren die relativen Häufigkeiten der Fragmente vergleichbar hoch über den gesamten m/z -Bereich des MS^2 . Trotz dieser hohen Fragmentierungseffizienz wurden keine signifikanten Neutralverluste oder Gasphasenumlagerungen zu anderen Phosphoakzeptoren festgestellt. Dies untermauert die hohe Stabilität der Phosphothiolatbindung unter EThcD-Bedingungen. Bemerkenswert ist außerdem, dass neben den ETD-typischen c- und z-Fragmenten eine lückenlose y-Serie auftrat, welche ebenfalls die labile Phosphorylierung trug (vgl. Abbildung 31c). Sie werden durch die zusätzliche HCD-Aktivierung erzeugt und bilden zusammen mit den Ionen der z-Serie ein „goldenes Doublett“. Bei einer optimalen EThcD Fragmentierung übersteigt deren Intensität in aller Regel nicht die der z-Ionen und der Fokus sollte auch immer auf der Generierung geschlossener c- und z-Ionenserien liegen. Dennoch zeigt dieses Beispiel anschaulich, dass wertvolle Informationen anhand dieser Ionenserie mit den diagnostischen Fragmenten y_3 und y_4 gewonnen werden können.

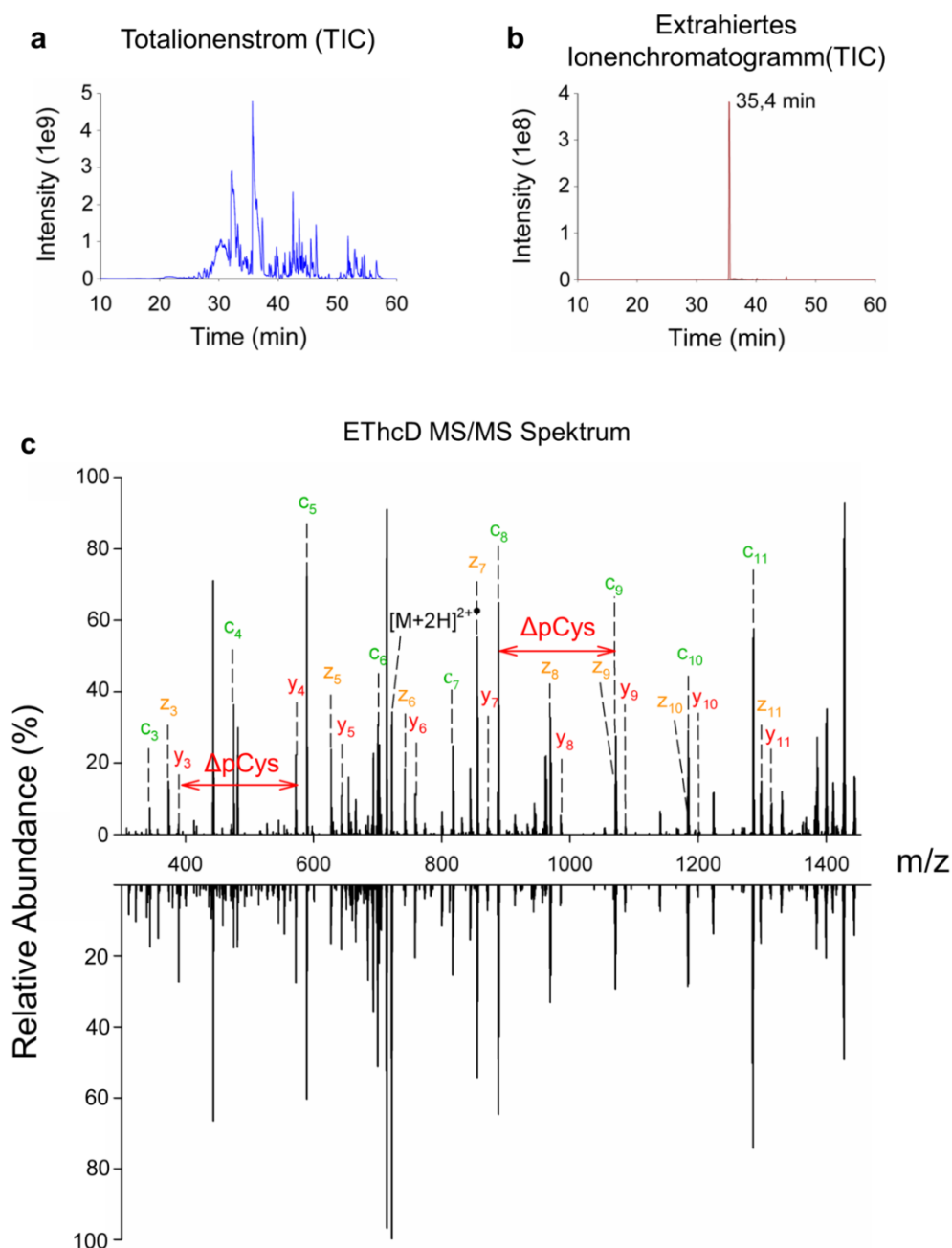


Abbildung 31: Nachweis einer natürlichen Cysteinphosphorylierung.

Abgebildet sind der TIC einer der Fraktionen des 2D-LC-MS/MS-Ansatzes (a) und das XIC des Precursorions (m/z 481,550) des endogenen pCys-Peptides ENITNLDApCITR (b). Diverse diagnostische Fragmente der c, y und z-Serie dokumentieren die Phosphorylierungsstelle. Das in der unteren Hälfte als Spiegelbild dargestellte EThcD-Spektrum des synthetisierten Peptides, stimmt in seinem Fragmentierungsmuster mit dem endogenen Peptid weitgehend überein (c).

Zur Verifizierung der endogenen Cysteinphosphorylierung wurde zusätzlich die entsprechende Peptidsequenz synthetisiert und unter den gleichen EThcD-Bedingungen analysiert. Das dazugehörige EThcD-Spektrum zeigt sowohl in Bezug auf die m/z -Verhältnisse als auch die Signalintensitäten der Fragmente eine hohe Übereinstimmung gegenüber dem endogenen Peptid (vgl. Abbildung 31 unten).

Diese Ergebnisse haben deutlich gezeigt, wie wertvoll die EThcD Fragmentierung bei der Identifizierung endogener Cysteinphosphorylierungen sein kann. Es gilt jedoch zu berücksichtigen, dass der targeted Ansatz ausschließlich zur Klärung der konkreten Fragestellung geeignet war. Die proteomweite Suche nach neuen Cysteinphosphorylierungen ist auf diesem Wege nicht möglich. Um aussagekräftige Spektren zu erhalten, wurden vorzugsweise Ladungszustände >2 gewählt. Es ist durchaus möglich, dass sich unter diesen Bedingungen auch hinreichende Ergebnisse mit der ETD oder ECD erzielen lassen. Wie bereits diskutiert, weisen beide jedoch erhebliche Defizite bei der Analyse doppelt geladener Precursorionen auf. Erste Untersuchungen doppelt protonierter pCys-Peptide mittels EThcD zeigten im Gegensatz dazu vielversprechende Ergebnisse. Sollte sich daraus ein allgemeiner Anspruch für die wichtigsten labilen Phosphorylierungen ableiten, würde die EThcD nicht nur über ein Alleinstellungsmerkmal gegenüber den anderen elektronenbasierten Techniken verfügen, sondern könnte entscheidend zur Identifikation neuer, endogener PTMs beitragen.

3.2 Tandem-MS von doppelt geladenen, labil phosphorylierten Peptiden

3.2.1 Vergleich ETD- und HCD-Fragmentierung labil phosphorylierter Peptide

In einem *bottom-up*-Ansatz ist der überwiegende Anteil der über Trypsinspaltung generierten Peptide nach der ESI doppelt geladen. Die Peptide erfahren in der Regel eine Protonierung der Aminogruppe am *N*-Terminus des Peptides und an den Seitenketten Lysin und Arginin des *C*-Terminus. Diese relativ kurzen Peptide weisen ein zufriedenstellendes Fragmentierungsverhalten unter CID-Bedingungen auf. Die exakte Lokalisierung der Phosphorylierungsstelle kann jedoch durch erhebliche Neutralverluste verhindert werden. ETD ist in der Lage diese labilen Modifikationen zu erhalten, eignet sich jedoch nur für Ladungszustände ≥ 3 (vgl. Abbildung 32 & Kapitel 1.2.5.3). Demzufolge ist die bedeutendste Quelle zur Identifizierung neuer, endogener labiler Phosphorylierungen nicht adäquat abgedeckt.

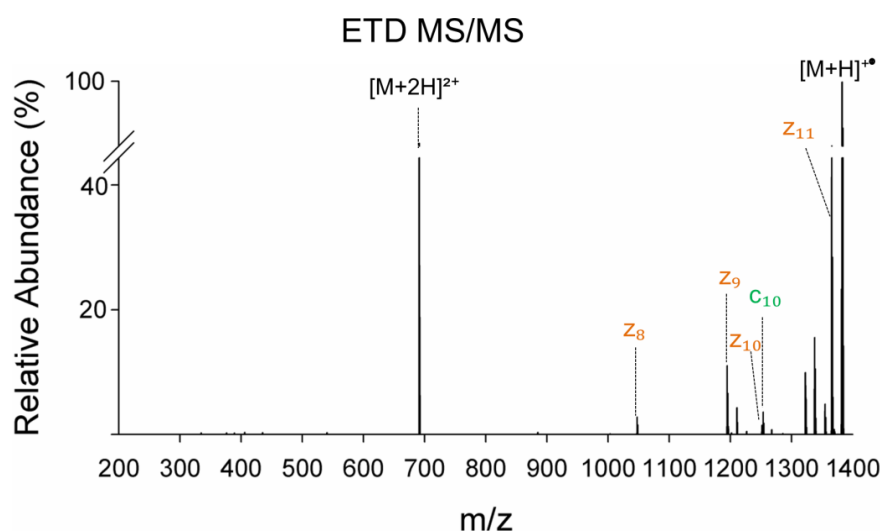


Abbildung 32: ETD-MS/MS-Spektrum des doppelt protonierten Peptides pArg 5 (NGFLVpREQDPK).

Das Spektrum ist dominiert von unfragmentierten Precursorionen und dem ladungsreduzierten Precursorion. Es stehen nur wenige Fragmentionen mit hohem m/z -Verhältnis zur Verfügung, sodass eine Bestimmung der Aminosäuresequenz sowie die Identifizierung der Argininphosphorylierung unmöglich sind.

Aufgrund dessen wurde die Fähigkeit von EThcD-MS/MS untersucht, labil phosphorylierte, doppelt geladene Peptide zu fragmentieren. Eigens dafür wurden durch Frau Hauser im Labor von Prof. Hackenberger 25 labil phosphorylierte Peptide synthetisiert.^{18, 22, 61, 271} Die Zusammenstellung beruhte aus bereits identifizierten oder potentiell modifizierten, endogenen Peptidsequenzen. Die Auswahl umfasste Peptide mit Phosphorylierungen von Arginin, Cystein, Histidin und Lysin sowie Pyrophosphorylierungen von Serin und Threonin. Bei der Wahl der Aminosäuresequenzen wurde sich auf Peptide beschränkt, die zuvor als doppelt geladene Precursorionen identifiziert wurden und deren Sequenz weitere

potentielle Phosphorylierungsstellen in direkter Nachbarschaft zur eigentlichen Modifikation enthielten.

Zunächst sollen jedoch kurz die Limitierungen der gängigen Fragmentierungstechniken ETD und HCD aufgezeigt werden: Bei der ETD werden Fluoranthenradikale im Überschuss mit Precursorionen in einer Ionenfalle in Kontakt miteinander gebracht. Die Fragmentierungseigenschaften von ETD sind dabei von der Reaktionszeit beider Spezies abhängig, wobei niedrige Ladungszustände längere Reaktionszeiten benötigen. Um zu gewährleisten, dass genügend Zeit für den ETD-Prozess zur Verfügung stand, wurde pArg5 mit verschiedenen Reaktionszeiten fragmentiert.

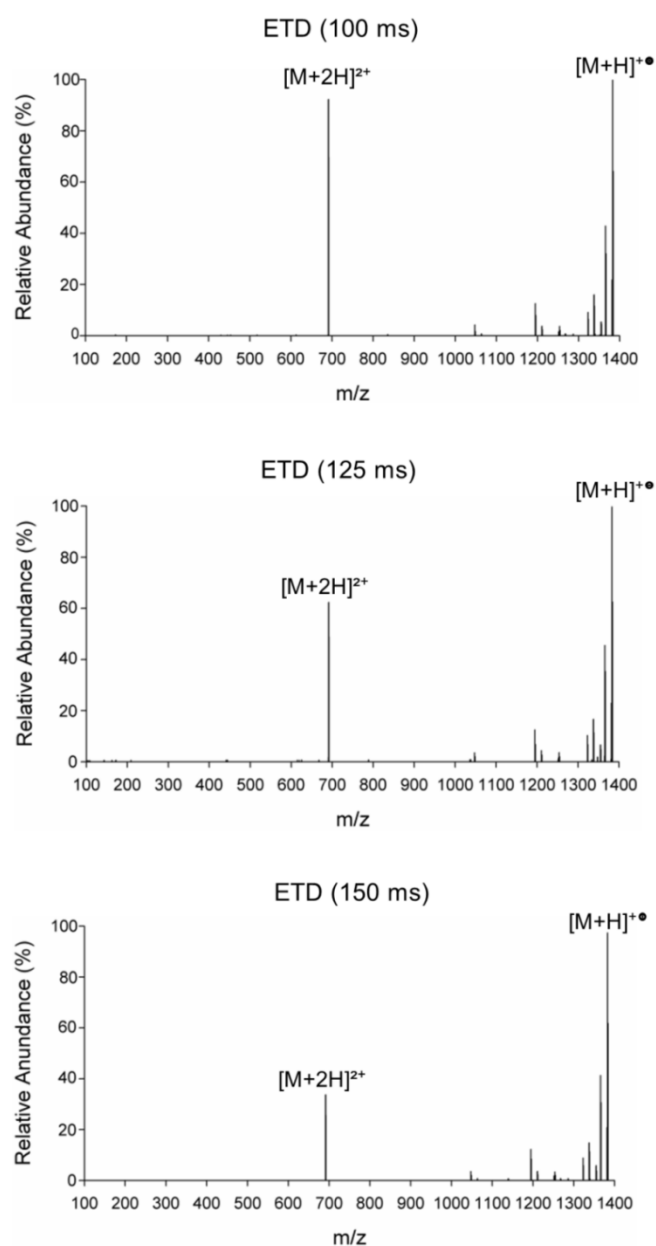


Abbildung 33: Gegenüberstellung der ETD-MS/MS Spektren des Peptides pArg5 mit verschiedenen ETD-Reaktionszeiten.

Die Abbildung 33 verdeutlicht, dass eine Verlängerung der ETD-Reaktionszeit über die ladungsabhängige Reaktionszeit von 100 ms hinaus keine Erhöhung der Fragmentierungseffizienz nach sich zieht. Es ließen sich weder neue Fragmentationen detektieren, noch ließ sich die relative Abundanz der bestehenden Fragmente signifikant beeinflussen, sodass Veränderungen der ETD-Reaktionszeit, dem wichtigsten Instrument zur Erhöhung des Informationsgehaltes eines MS/MS-Spektrums, wirkungslos blieben. Einzig das Verhältnis von Precursor- und ladungsreduziertem Precursorion lässt sich damit manipulieren. Diese Beobachtung ist für die EThcD-Fragmentierung von Bedeutung, da sich somit steuern lässt, welche der beiden Spezies vorwiegend für die zusätzliche *all-ion*-Fragmentierung zur Verfügung stehen soll.

Als nächstes wurden HCD-Spektren des argininphosphorylierten Peptides pArg5 akquiriert. Diese wiesen eine ausreichende Fragmentierung des Peptidrückgrates auf, sodass das Peptid zweifelsfrei identifiziert werden konnte. Gleichzeitig wurde jedoch, wie bereits bei den pCys-Peptiden festgestellt (vgl. Kapitel 3.1.2), ein substantieller Verlust der labilen Modifikation, beobachtet. Neutralverluste von 80, 98 und 116 Da sowohl an Ionen der b-Serie als auch der y-Serie zählten zu den abundantesten Signalen (vgl. Abbildung 34). Modifikationstragende Fragmentationen wurden entweder überhaupt nicht oder mit äußerst geringen relativen Häufigkeiten detektiert.

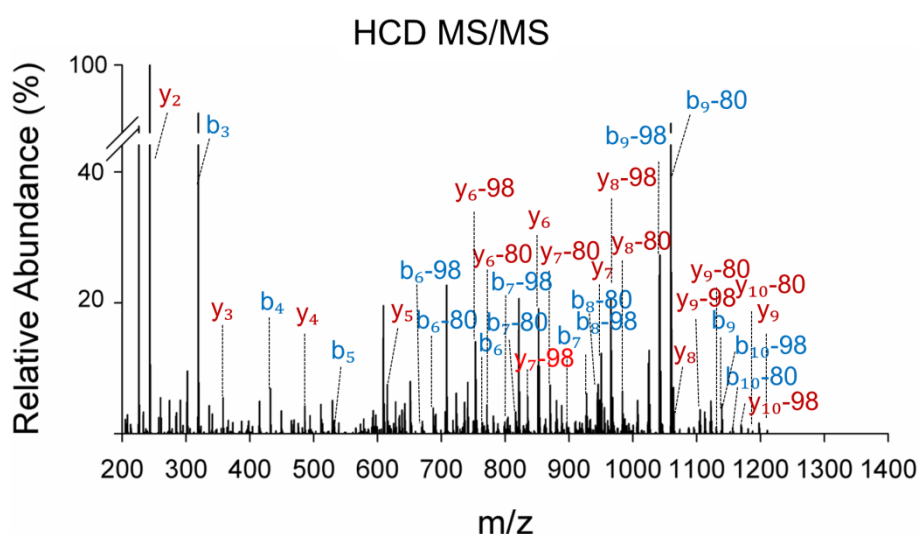


Abbildung 34: HCD-Spektrum des doppelt protonierten Peptides NGFLVpREQDPK.

Das Spektrum zeigt eine lückenlose Sequenzabdeckung, sodass sich daraus die Aminosäuresequenz sicher ableiten lässt. Die Lokalisierung der labilen Phosphorylierung ist jedoch durch substantielle Neutralverluste von 80 Da und 98 Da an b- und y-Ionen signifikant erschwert.

3.2.2 EThcD-Fragmentierung doppelt geladener, labil phosphorylierter Peptide

Die unbefriedigenden Ergebnisse der ETD und HCD-Studien waren der Ausgangspunkt für weiterführende Untersuchungen, bei denen der Einfluss zusätzlicher HCD-Aktivierung nach dem ETD-Prozess auf das Fragmentierungsverhalten labiler Phosphorylierung betrachtet wurde. Im ersten Schritt wurde dazu das Peptid mit einer kalibrierten ladungsabhängigen ETD-Reaktionszeit von ca. 100 ms angeregt und danach die gesamte Ionenpopulation mit verschiedenen, zusätzlichen Aktivierungsenergie fragmentiert.²¹⁴ Um sicher zu stellen, dass die Ergebnisse der Fragmentierung ausschließlich aus den verschiedenen Fragmentierungsbedingungen resultierten, wurden nur Spektren berücksichtigt, welche die maximale Injektionszeit von 500 ms nicht ausgenutzt hatten. Somit wurde sichergestellt, dass für jedes untersuchte Spektrum der Targetwert erreicht wurde und immer die gleiche Anzahl an Ionen für die Fragmentierung zur Verfügung stand. Um mögliche, geringfügig Varianzen in Bezug auf den ETD-Prozess oder die CE der zusätzlichen HCD-Aktivierung zu egalisieren, wurden jeweils drei technische Replikate jeder Fragmentierungsbedingung analysiert.

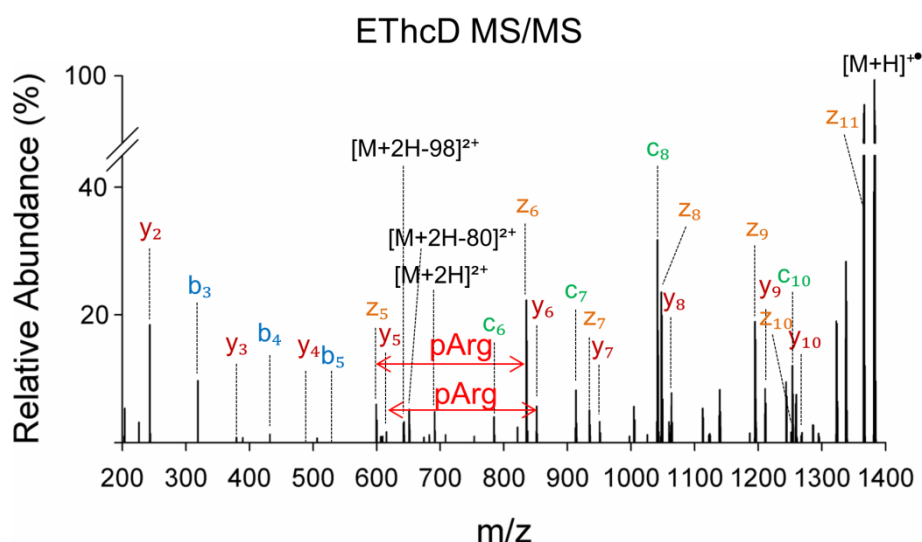


Abbildung 35: ETHCD-Spektrum des doppelt protonierten Peptides NGFLVpREQDPK.

Das Spektrum zeigt eine lückenlose Sequenzabdeckung, erzielt mit Fragmentionen aus vier verschiedenen Ionenserien (b, c, y & z). Die Fragmente tragen die labile Modifikation und ermöglichen die zweifelfreie Lokalisierung der Phosphorylierung an Position Arg6. Als diagnostische Fragmentionen sind die Fragmente y₆ und z₆ zu erkennen. Sie bilden ein sogenanntes „goldenes Dublette“. Darüber hinaus sind Ionen resultierend aus Neutralverlusten ausgehend vom Precursorion zu erkennen. Neutralverluste, welche von Fragmentionen stammen, sind nicht zu verzeichnen. Das ladungsreduzierte Precursorion stellt den Basepeak des Spektrums dar.

Der wesentliche Nachteil von ETD war die mangelnde Fragmentierung von Precursor- und ladungsreduzierten Precursorionen. Spektren, aufgezeichnet mit einer zusätzlichen Aktivierung von 20% NCE, wiesen im Mittel eine relative Abundanz von 50% für Precursorionen auf. Eine sukzessive Erhöhung

der zusätzlichen Aktivierung auf 35% NCE führte zu einer kompletten Fragmentierung des Vorläufers (vgl. Abbildung 36).

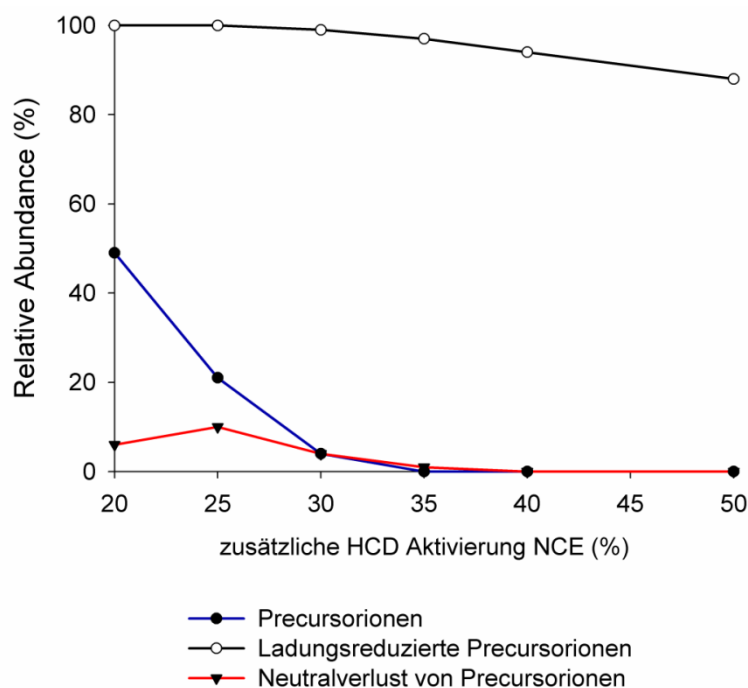


Abbildung 36: Durchschnittliche relative Abundanz von Precursorionen, ladungsreduzierten Precursorionen und Neutralverlusten von Precursorionen.

Es wurden kalibrierte, ladungsabhängige ETD-Bedingungen (≈ 100 ms) gewählt und die zusätzliche Aktivierung (sa) variiert.

Wesentlich geringer war der Einfluss der zusätzlichen Aktivierung auf die Intensität des ladungsreduzierten Precursorions. Bei Kollisionsenergien 20% und 25% NCE bildete das ETnoD-Produkt für alle untersuchten Modellpeptide den Basepeak des Fragmentspektrums. Selbst sehr hohe Aktivierungsenergien führten zu keiner kompletten Fragmentierung dieser Spezies, sodass das ladungsreduzierte Precursorion bei der überwiegenden Mehrheit der Peptide das höchstabundanteste Signal darstellte. Dies untermauert die hohe Stabilität des Radikalanionenkomplexes.

HCD-Spektren von labil phosphorylierten Peptiden weisen meist Neutralverluste des Precursorions auf. Und in der Tat führte auch die zusätzliche HCD-Aktivierung bei der EThcD-Fragmentierung zu geringfügigen Neutralverlusten ausgehend von den Precursorionen, wobei zusätzliche Aktivierungen von 20-35% die stärksten Neutralverlustesignale hervorriefen. Diese Beobachtung war zu erwarten, da vor der zusätzlichen HCD-Fragmentierung ein großer Anteil der Ionenpopulation von intakten Precursorionen eingenommen wird und die Anregung einer herkömmlichen HCD-Fragmentierung gleicht. Die Art und Intensität des Neutralverlustes waren dabei stark von der Modifikation und der Peptidse-

quenz abhängig. Ein klares Muster war anhand der untersuchten Peptide nicht zu erkennen (siehe Anhang). Geringfügige Neutralverluste der Precursorionen sind nicht zwangsläufig als negativ zu bewerten, da somit wichtige Zusatzinformationen über die Art der Phosphorylierungen erhalten werden können. Beispielsweise erzeugen pyrophosphorylierte Peptide einen diagnostischen Neutralverlust von 177,943 Da. Dieser Neutralverlust lässt sich zum Teil auch in EThcD-Spektren nachweisen und kann demzufolge als zusätzlicher Indikator für diese Modifikation fungieren.

Erheblich wichtiger für die zuverlässige Lokalisierung labiler Phosphorylierungen ist die Generierung von Fragmentationen, welche die Modifikation tragen. Auf Grund dessen wurde die Stabilität der Modifikationen unter EThcD und HCD-Bedingungen untersucht. Als Modellsystem wurde eine Peptidsequenz des adhäsions- und degranulationsunterstützenden Adapterproteins ADAP gewählt. Die Peptidsequenz wurde beibehalten und nur die Phosphorylierungsstelle an Position acht ausgetauscht. In seiner Größe entspricht die Sequenz einem typischen, durch tryptischen Verdau entstandenen Peptid. Darüber hinaus beinhaltet die Sequenz weitere potentielle Phosphoakzeptoren, wie z.B. einen Serinrest an Position 10, sodass mögliche Gasphasenumlagerungen der Phosphorylierungen während der Ionisierung oder Fragmentierung erfasst werden können.⁶⁹

In Abbildung 37 sind die Signalintensitäten der Fragmentationen mit und ohne Neutralverlust für HCD und EThcD gegenübergestellt. Labile Modifikationen generieren in der Regel verschiedene Neutralverluste. In der Abbildung wurde sich auf die abundantesten beschränkt. Für pArg, pCys, pHis und pLys wurde die Abspaltung von 98 Da und für die Pyrophosphorylierungen von Serin und Threonin die Eliminierung von 178 Da berücksichtigt. Der Vergleich illustriert beeindruckend die hohe Labilität der Modifikationen gegenüber HCD und die außerordentliche Stabilität unter EThcD-Bedingungen. Betrachtet man die y-Ionenserie der HCD-Fragmentierung so wird deutlich, dass sich keine Fragmentationen detektieren ließen, die einen Pyrophosphatrest trugen. Ähnliche Tendenzen zeigten pArg2 und pCys3. Die Sequenz war zwar lückenlos abgedeckt, Fragmentationen ohne Neutralverlust waren jedoch entweder gar nicht oder nur mit äußerst geringen relativen Abundanzen nachzuweisen. Die höchste Stabilität zeigte interessanterweise das lysinphosphorylierte Peptid pLys3. Signale, die aus Neutralverlusten resultierten, stellten zwar wiederum die dominantesten Signale dar, es konnten jedoch auch modifikationstragende Fragmentationen (y_5 bis y_8) mit beachtlichen relativen Intensitäten von ca. 10% detektiert werden.

Neben dem Neutralverlust von 98 Da wurden für pArg, pCys, pHis und pLys weitere Neutralverluste von 80 Da und 116 Da in den HCD-Spektren erfasst. Demzufolge spalten sich Fragmentationen, welche eine labile Modifikation tragen, in bis zu vier verschiedene Spezies auf. Für die bioinformatische Analyse bedeutet dies eine Erhöhung der Komplexität des Spektrums ohne einen Zugewinn an Informationen zur Phosphorylierungslokalisierung. Außerdem senkt die Verteilung auf mehrere Fragmentspezies die Intensität des gewünschten, modifizierten Fragmentions. Summa summarum zieht dies eine Reduktion der Empfindlichkeit in Bezug auf die Fähigkeit der korrekten Lokalisierung der Phosphorylierungsstelle nach sich.

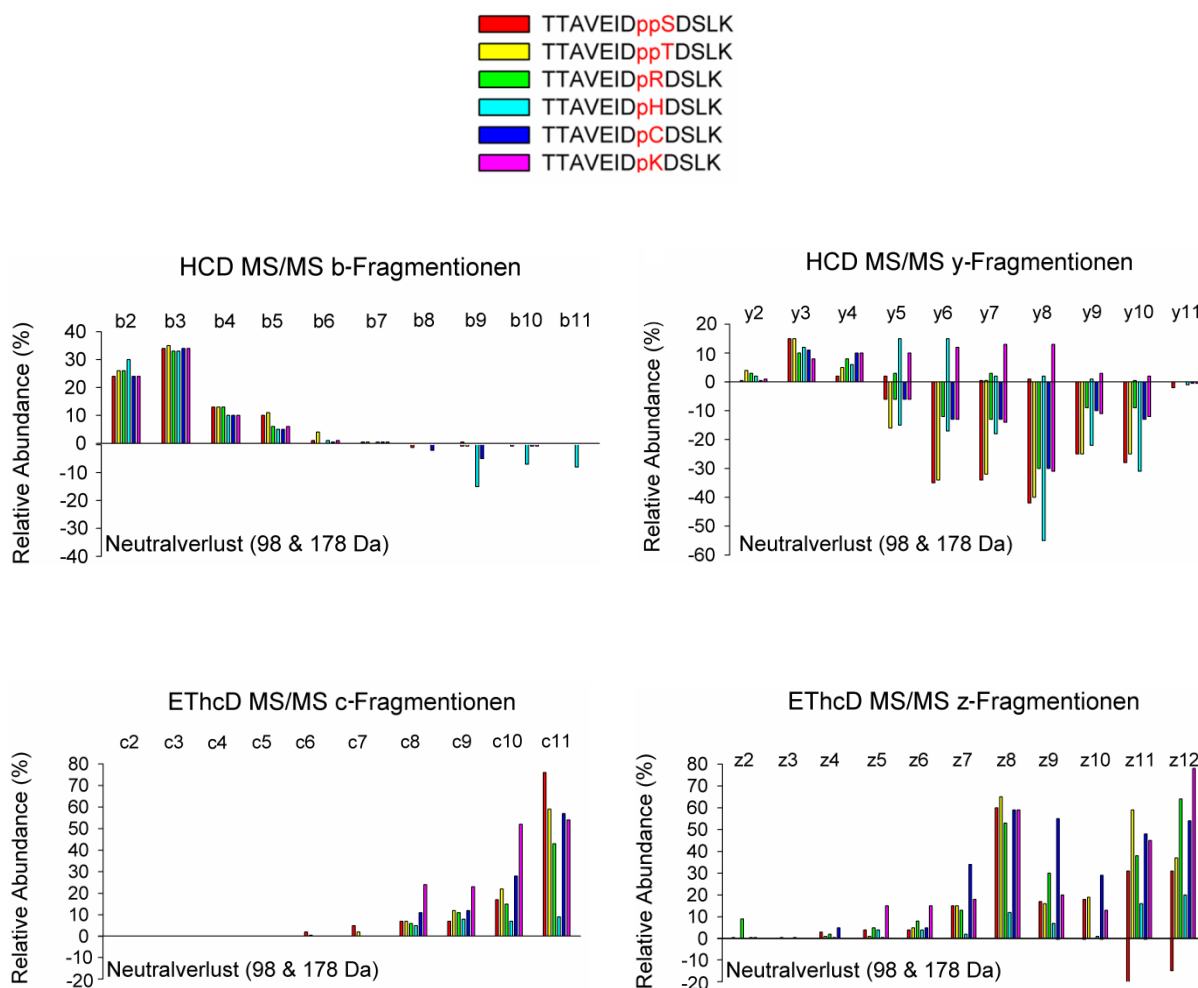


Abbildung 37: Gegenüberstellung der relativen Abundanzen von Fragmentationen und deren Neutralverlustspezies während HCD und EThcD.

Der Vergleich zeigt einen substanziellen Neutralverlust von 98 Da für die Peptide pArg2, pHis3, pCys2 und pLys3 sowie den Verlust von 178 Da für ppSer2 und ppThr4 unter HCD-Bedingungen. Die c- und z-Ionen der EThcD-Fragmentierung zeigen entweder keine oder vernachlässigbar kleine Neutralverluste.

Die Ergebnisse der EThcD MS/MS-Experimente standen in einem deutlichen Gegensatz dazu. Für alle Phosphorylierungstypen ließen sich hochabundante Fragmentationen, welche die Modifikation trugen, beobachten. Mit Ausnahme der Fragmentationen z_{11} und z_{12} des Peptides ppSer2 wurden keine Neutralverlustspezies für die untersuchten Peptide detektiert. Auch eine Migration von Phosphatresten zum Beispiel hin zum Serinrest S10 wurde nicht beobachtet. Vor dem Hintergrund der hohen Labilität der Modifikation und der besonderen Herausforderung der Kürze der Peptide ist dies ein bemerkenswertes Ergebnis.

Die übereinandergelegten Fragmentspektren verdeutlichen außerdem die typische Struktur eines EThcD-Spektrums doppelt geladener Precursorionen. Tendenziell steigt die relative Abundanz der aus dem ETD-Prozess stammenden c- und z-Fragmentationen mit ihrem m/z -Verhältnis. Infolgedessen werden Fragmente mit niedrigem m/z -Verhältnis entweder gar nicht oder nur in sehr geringen Intensitäten

detektiert. Komplette Sequenzabdeckungen anhand einer Ionenserie sind daher die Ausnahme. Aufgrund der Komplementarität der c- und z-Ionenserien, ist eine lückenlose Sequenzabdeckung dennoch möglich. Der Trend, dass Fragmentationen mit hohem m/z -Verhältnis auch hohe relative Intensitäten aufweisen, leitet sich aus dem Mechanismus der ETD-Fragmentierung ab (vgl. Kapitel 1.2.5.3; Abbildung 21). Das doppelt geladene Precursorion trägt seine beiden positiven Ladungen an den Termini des Peptides. An diesen Positionen wird das Elektron bevorzugt lokalisiert sein und Spaltungen der nächstgelegenen N-C $_{\alpha}$ -Bindung des Peptidrückgrates provozieren. Das kürzere Bruchstück wird als neutrales Radikal nicht erfasst, während das längere Fragment die positive Ladung des gegenüberliegenden Terminus trägt und als einfach geladenes Fragment detektiert wird. Um kürzere Fragmentationen zu generieren, muss das Elektron demzufolge weiter entlang des Peptidrückgrates migrieren ohne zuvor eine der näher gelegenen Peptidbindungen zu spalten.

3.2.3 Bioinformatische Evaluierung der HCD- und EThcD-Spektren

Diese Ergebnisse waren der Ausgangspunkt für weiterführende softwaregestützte Untersuchungen von EThcD-Spektren doppelt geladener Precursorionen. Zur Beurteilung der Spektrenqualität und als Parameter für die Sicherheit der Phosphorylierungslokalisierung, wurden nach den verschiedenen EThcD-Experimenten die Suchalgorithmen Sequest und *ptmRS* eingesetzt.⁸⁵ Zuerst wurde der Einfluss der zusätzlichen Aktivierung auf die Spektrenqualität beurteilt. Eine zusätzliche Aktivierung von 20% führte sowohl zu der niedrigsten Anzahl an *unique* Peptiden als auch zu den geringsten durchschnittlichen Sequest Xcorr Scores (vgl. Tabelle 2). Des Weiteren hatte die unzureichende Fragmentierung von Precursor- und ladungsreduzierten Precursorionen sowie das Fehlen von diagnostischen Fragmentationen zur Bestimmung der Phosphorylierungsstelle eine signifikante Anzahl an falsch lokalisierten Phosphorylierungsstellen zur Folge.

Eine Erhöhung der zusätzlichen Aktivierung auf 30% lieferte zugleich die höchste Anzahl an *unique* Peptiden und korrekt lokalisierten Phosphorylierungsstellen. Außerdem ließen sich somit die höchsten Sequest Xcorr Werte erzielen. Diese Beobachtung ist von wesentlicher Bedeutung, da vergleichbare Fragmentierungsbedingungen bereits erfolgreich bei der Analyse von *O*-Phosphorylierungen eingesetzt wurden.²³⁸ Somit müssen keine Anpassungen der Fragmentierungsparameter vorgenommen werden, um die verschiedenen Phosphorylierungstypen adäquat abzudecken. NCEs von 25% und 35% führten entweder zu einer etwas reduzierten Anzahl an identifizierten Peptiden, niedrigeren mittleren Sequest Xcorr Scores oder Identifizierungsraten (ID-Rate) im Vergleich zu 30% zusätzlicher Aktivierung. Allgemein sind die Unterschiede innerhalb dieses CE-Bereiches allerdings gering. Somit ist gewährleistet, dass geringfügige Veränderungen innerhalb dieses durchaus komplexen tandemmassenspektrometrischen Experiments, keinen gravierenden Einfluss auf die Qualität der Spektren haben und die Methodik daher über eine ausreichende Robustheit verfügt.

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 2: Durchschnittlicher Sequest Xcorr Score, Identifizierungsrate, Anzahl an *unique* Peptiden und korrekt lokalisierten Phosphorylierungsstellen unter verschiedenen zusätzlichen Aktivierungen.

Peptid	Peptidsequenz (Herkunft)	Durchschnittlicher Sequest Xcorr Score pro Peptid						
		HCD	EThcD 20%	EThcD 25%	EThcD 30%	EThcD 35%	EThcD 40%	EThcD 50%
ppSer 1	TAVEIDppSDSLK* (ADAP-human)	1,98	2,93	3,1	3,6	3,67	3,67	-
ppSer 2	TTAVEIDppSDSLK* (ADAP-human)	2,3	3,11	3,34	3,83	3,96	4,1	3,86
ppSer 3	SSEDppSSEEDKA (Nopp140-mammalian)	3,37	3,33	4,14	4,35	4,71	4,94	5
ppThr 4	TTAVEIDppTDSLK* (ADAP-human)	2,49	3,1	3,43	3,91	4	4,1	3,82
pHis 1	AVEIDpHDSLK* (ADAP-human)	2,23	3,71	3,55	4,26	3,82	3,71	-
pHis 2	TAVEIDpHDSLK* (ADAP-human)	2,77	3,4	3,47	4,41	3,75	3,5	4,16
pHis 3	TTAVEIDpHDSLK* (ADAP-human)	2,91	2,5	3,14	3,92	3,98	3,9	3,61
pHis 4	FATpHGGYLLQ GK (AdhE- <i>E.coli</i>)	3,17	3,22	3,39	4,79	4,91	4,44	4,09
pHis 5	GGRTCPHAAIIAR (PpsA- <i>E.coli</i>)	3,88	-	2,14	2,84	3,01	3,36	4,05
pCys 1	AVEIDpCDSLK* (ADAP-human)	-	3,26	3,8	4,02	-	-	-
pCys 2	TAVEIDpCDSLK* (ADAP-human)	2,43	3,16	3,82	3,91	4,16	3,92	3,73
pCys 3	TTAVEIDpCDSLK* (ADAP-human)	2,71	3,09	4,11	4,24	4,24	4,02	4,03
pCys 4	EQLpCFSLYNAQR* (MgrA- <i>S.aureus</i>)	3,24	3,1	4	4,04	4,07	3,92	3,74
pCys 5	ENITNLDAPCITR* (IICB ^{Glc} - <i>E.coli</i>)	3,03	3,44	3,99	4,61	4,18	-	3,56
pArg 1	TAVEIDpRDSLK* (ADAP-human)	3,31	-	-	4,36	3,9	3,97	-
pArg 2	TTAVEIDpRDSLK* (ADAP-human)	4,09	-	4,1	4,54	4,12	3,97	-
pArg 3	FTSEpRGYIVESK* (ctsR- <i>B. subtilis</i>)	4,09	3,04	5,07	4,42	5	4,46	5,75
pArg 4	GFLVpREQDPK* (ykoM- <i>B. subtilis</i>)	3,19	-	-	3,62	-	-	-
pArg 5	NGFLVpREQDPK* (ykoM- <i>B. subtilis</i>)	3,05	3,14	4,06	4,16	4,25	4,07	3,89
pLys 1	AVEIDpKDSLK* (ADAP-human)	2,69	3,36	4,37	4,78	4,74	4,65	4,59
pLys 2	TAVEIDpKDSLK* (ADAP-human)	3,37	3,39	4,19	4,42	4,49	4,37	3,91
pLys 3	TTAVEIDpKDSLK* (ADAP-human)	3,41	3,34	4,4	4,79	4,58	4,42	4,26
pLys 4	LpKTEAEMK* (Myoglobin-mammalian)	2,97	3,02	3,88	4,18	4,21	4,13	4,17
pLys 5	HLpKTEAEMK* (Myoglobin-mammalian)	2,51	-	3,94	3,9	3,92	4,01	4
pLys 6	ALELFRpKDAAK* (Myoglobin-mammalian)	2,63	3,03	-	3,72	-	-	-
Durchschnittlicher Sequest Xcorr Score		3,04	3,20	3,83	4,17	4,16	4,10	4,09
Identifizierungsrate (%)		84,7	35,1	40,0	63,5	55,0	45,3	35,5
# <i>unique</i> Peptide		24/25	20/25	23/25	25/25	22/25	21/25	16/25
# Phosphorylierungsstellen mit einer <i>ptmRS</i> Positionswahrscheinlichkeit >99%		21/25	17/25	21/25	22/25	21/25	20/25	14/25
# Korrekt lokalisierte Phosphorylierungsstellen mittels <i>ptmRS</i>		14/25	11/25	20/25	21/25	20/25	19/25	13/25

- nicht identifiziert; *Peptidsequenz enthält einen amidierten C-Terminus

Der Einsatz von 40% zusätzlicher Energie sorgte für eine weitere Erhöhung der relativen Intensitäten der Fragmentationen. Am Beispiel des Peptides pArg5 wurde deutlich, dass darunter auch Fragmentationen waren, welche die Argininphosphorylierung trugen. Dies untermauert ein weiteres Mal, dass die labilen Phosphorylierungen stabil über einen weiten Bereich an zusätzlichen Aktivierungsenergien sind. Da jedoch keine zusätzliche Fragmente detektiert wurden, erhöhte sich auch der durchschnitt-

liche Sequest Xcorr Score nicht. In Abbildung 38 sind die relativen Intensitäten der einzelnen Fragmentationen unter verschiedenen zusätzlichen Aktivierungsenergien gegenübergestellt.

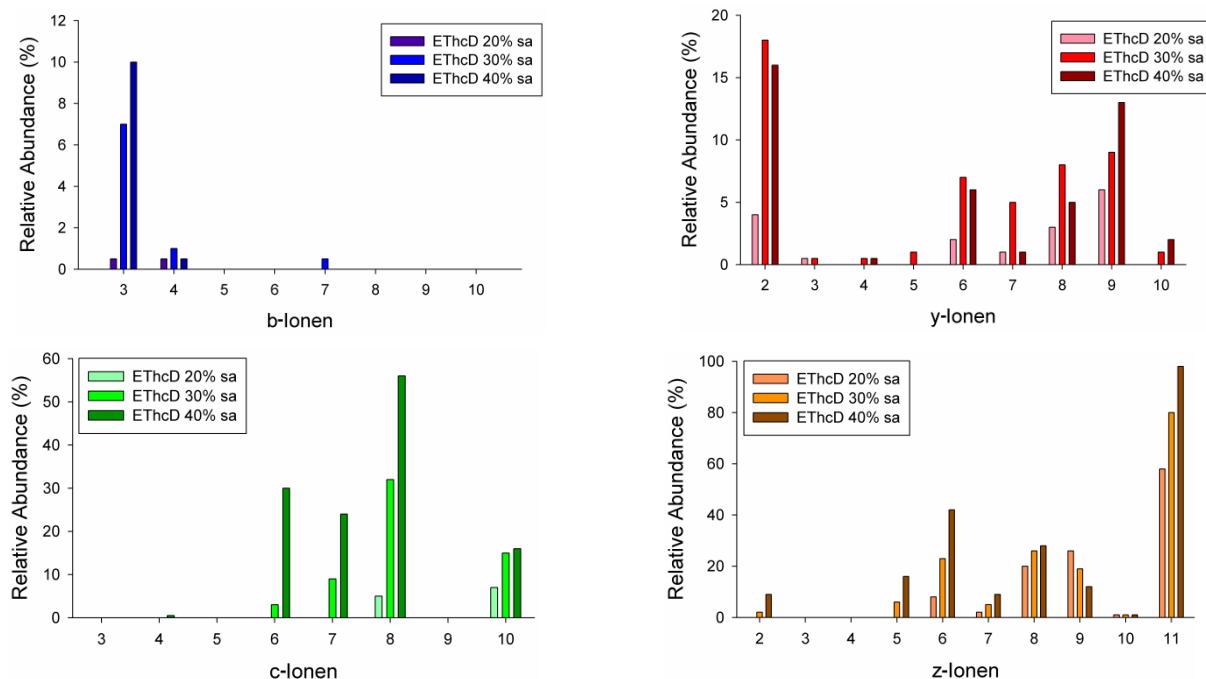


Abbildung 38: Relative Abundanzen von b-, c-, y- und z-Fragmentationen (%) des Peptides NGFLVpREQDPK (pArg 5) unter verschiedenen EThcD-Bedingungen.

Der ETD-Prozess wurde mit ladungsabhängigen ETD-Parametern durchgeführt und verschiedene zusätzliche HCD-Aktivierungsenergien eingesetzt. Mit steigender NCE nehmen auch die relativen Abundanzen der Fragmentationen aller Ionenserien zu.

Die Abbildung illustriert im Wesentlichen drei Aspekte: Zum einen gehören die dominierenden Fragmentationen den c- und z-Ionenserien an. Darüber hinaus können die zusätzlichen b- und y-Ionen weitere Informationen über die Peptidsequenz liefern. So ergänzen die Fragmentation b_3 , y_3 und y_4 die unvollständigen c- und z-Serien. Am wichtigsten ist jedoch, dass auch b- und y-Ionen die labile Modifikation tragen können, wie die lückenlose y-Ionenserie unterstreicht.

Ein Vergleich der EThcD-Ergebnisse generiert mit einer zusätzlichen Aktivierung von 30% mit HCD-Daten unter Verwendung der gleichen AGC-Targetwerte zeigte, dass EThcD eine geringere Identifizierungsrate als HCD erbrachte. Dies mag in einer geringeren Fragmentierungseffizienz gegenüber HCD begründet liegen. Die Identifizierungsrate war dabei sehr von der Aminosäuresequenz abhängig. Bei der Gesamtkalkulation wurde dies berücksichtigt. Erfolgte die Zuordnung des Spektrums zu einer Peptidsequenz, so war der durchschnittliche Sequest Xcorr Score jedoch höher als bei HCD. Diese Tendenz wurde bereits in proteomischen Studien mit einer weitaus größeren Anzahl an Peptiden beobachtet und unterstreicht die hohe Sequenzabdeckung und geringe Anzahl unspezifischer Fragmente.²⁰⁹

Von den 25 identifizierten Peptiden wurden 22 mit einer *ptmRS* Positionswahrscheinlichkeit für die Modifikation >99% zugeordnet. Eine Zuordnung mit dieser Wahrscheinlichkeit wird allgemein als eine zweifelsfreie Bestimmung der Modifizierungsstelle angesehen. Und in der Tat wurde bei 21 Peptiden die Phosphorylierungsstelle korrekt von der Suchmaschine erkannt. Nur in einem Fall reichte die Sequenzabdeckung nicht für eine fehlerfreie Identifizierung aus und sorgte für ein falschpositives Ergebnis. Zusätzlich wurden zwei Peptide mit einer *ptmRS* Positionswahrscheinlichkeit von <99% annotiert. Eine detaillierte Betrachtung der Spektren ließ jedoch eine zweifelsfreie Lokalisierung der Phosphorylierungsstelle zu. Führt man sich vor Augen, dass für keines der Peptide eine korrekte Lokalisierung der Phosphorylierungsstelle mittels ETD möglich war, ist dies ein bemerkenswertes Resultat.

Im Gegensatz dazu standen die Ergebnisse aus den HCD-Messungen. Von den 25 untersuchten Peptiden konnte nur bei 13 die Phosphorylierungsstelle korrekt identifiziert werden. Insbesondere die Identifizierung der pyrophosphorylierten Peptide, welche als doppelt phosphoryliert erkannt wurden, stellte eine Herausforderung dar. Aber auch die korrekte Lokalisierung von histidin-, cystein-, arginin- und lysinphosphorylierten Peptiden war aufgrund des erheblichen Neutralverlustes und/ oder dem Fehlen diagnostischer Fragmentationen erschwert. Bemerkenswerterweise bestand eine erhebliche Diskrepanz zwischen der Anzahl an annotierten Phosphorylierungsstellen mit einer *ptmRS* Positionswahrscheinlichkeit von >99% und der Anzahl an korrekt lokalisierten Positionen (vgl. Tabelle 2). Dies unterstreicht nochmals, dass die inhärente Labilität der Modifikationen zu einer signifikanten Anzahl an falsch zugeordneten Phosphorylierungsstellen während der datenbankgestützten Suche führen kann, für die zweifelsfreie Erkennung eine manuelle Verifizierung angezeigt ist und die HCD-Spektren dafür nur eine unbefriedigende Datengrundlage bieten.

3.2.4 Optimierung der EThcD-Bedingungen

Da die Zykluszeit eine entscheidende Rolle in phosphoproteomischen Studien spielt, wurde der Einfluss der ETD-Reaktionszeit auf die Spektrenqualität untersucht. In diesem Fall wurde die zusätzliche Aktivierung von 30% beibehalten und ausschließlich die Reaktionszeit variiert. Lange Reaktionszeiten verschieben das Verhältnis zwischen Precursor- und ladungsreduziertem Precursor in Richtung des nicht-dissoziativen ETnoD-Produktes. Daraus resultierte, dass kurze Reaktionszeiten hochabundante Precursorionen generierten, welche durch die zusätzliche HCD-Fragmentierung zu b- und y-Fragmentationen hoher Intensität führten. Dies sei mit Hilfe EThcD MS/MS-Spektrums des argininphosphorylierten Peptides pArg5 gezeigt (vgl. Abbildung 39).

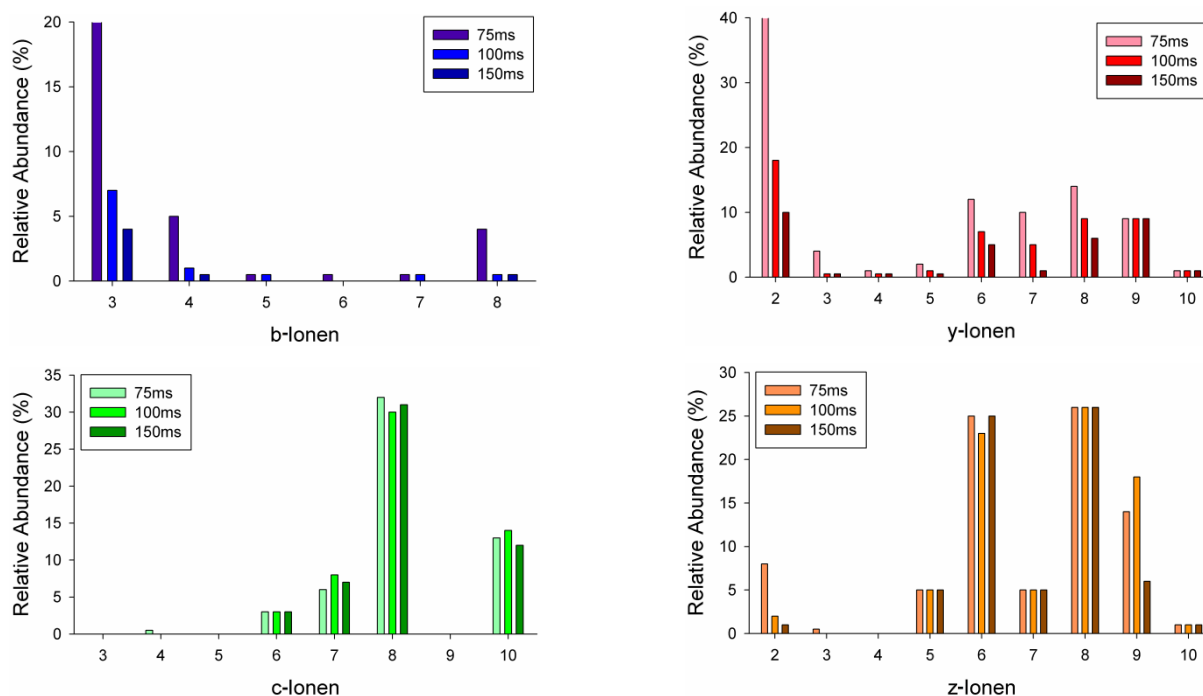


Abbildung 39: Durchschnittliche relative Abundanzen (%) der b-, c-, y- und z Fragmentionen des Peptides pArg5 bei einer zusätzlich Aktivierung von 30% und unter unterschiedlichen Reaktionszeiten.

Mit steigender Reaktionszeit nimmt der Anteil an Precursorionen ab. Infolgedessen die relativen Intensitäten von b- und y-Ionen sinken.

Interessanterweise wurden die relativen Häufigkeiten der c- und z-Ionen kaum von den unterschiedlichen ETD-Reaktionszeiten beeinflusst. Diese Tendenz legte Nahe, dass auch kürzere Reaktionszeiten als 100 ms zu vergleichbaren Ergebnissen führen würden und sich somit die Zykluszeit effektiv verkürzen ließe. Die globale, bioinformatisch gestützte Analyse zeigte jedoch, dass sich zwar für einen überwiegenden Teil der Peptide der Sequest Xcorr Score erhöhte, andere Peptide jedoch gar nicht identifiziert werden konnten und daher die Identifizierungsrate sank. Auf der anderen Seite zog auch die Verlängerung der Reaktionszeit auf bis zu 150 ms keine signifikante Verbesserung der Identifizierungsrate oder des Sequest Xcorr Scores nach sich, sodass auf diesen zusätzlichen Zeitaufwand verzichtet werden konnte (vgl. Abbildung 40b).

Allgemein war der Einfluss der Reaktionszeit auf die Identifizierungsrate und den Sequest Xcorr Score geringer als die Auswirkungen der zusätzlichen Aktivierungsenergie, sodass Reaktionszeiten zwischen 75 ms und 125 ms eine zuverlässige Fragmentierung doppelt geladener Precursorionen ermöglichten. Diese Beobachtung unterstreicht nochmals die hinreichende Robustheit von EThcD. Herauszustellen ist, dass bei der Beurteilung eines EThcD-Spektrums zu allererst das Verhältnis zwischen c-/z- und b-/y-Ionenpaaren zu berücksichtigen ist. Sollte das Spektrum von b- und y-Ionen dominiert sein und die essentiellen c-/z-Ionen in geringen Abundanzen vorliegen oder gar fehlen, so kann dies in einer zu kurzen Reaktionszeit oder einer nicht ausreichenden Menge an zur Verfügungen stehenden Flouran-

thenradikalen für den ETD-Prozess begründet liegen. In der Regel ist die EThcD-Fragmentierung weniger empfindlich als HCD. Dies äußert sich darin, dass mindestens fünfmal mehr Ionen (AGC-Targetwert: $5e4$ gegenüber $1e4$) gesammelt werden müssen, um ein datenreiches Spektrum zu generieren. Eine Reduktion des Targetwertes könnte zu einer substanziellen Verkürzung der Injektions- und Zykluszeiten führen. Vor diesem Hintergrund wurden EThcDMS/MS-Spektren mit einer ETD-Reaktionszeit von 100 ms, einer zusätzlichen Aktivierung von 30% und verschiedenen AGC-Targetwerten aufgezeichnet. Abbildung 40c ist zu entnehmen, dass bereits eine Reduktion des Targetwertes um 20% zu einer Halbierung der zugeordneten MS/MS-Spektren führte. Eine Verdoppelung des Targetwertes erhöhte auch den Sequest Xcorr Score und die Identifizierungsrate auf nahezu 70%. Dies hatte jedoch keine Auswirkungen auf die Anzahl der korrekt bestimmten Phosphorylierungsstellen. Bedenkt man, dass die Höhe des Targetwertes in direktem Zusammenhang mit der Länge Injektionszeit steht, so würde ein Targetwert von $1e5$ die Zykluszeit nur unnötig verlängern ohne einen signifikanten Informationsgewinn zu bieten. Ist jedoch die Anzahl an generierten EThcD MS/MS-Spektren, wie z.B. in einem Targeted-Approach, begrenzt oder gilt es erheblich größere Moleküle zu analysieren, so können Targetwerte in dieser Größenordnung durchaus sinnvoll sein.

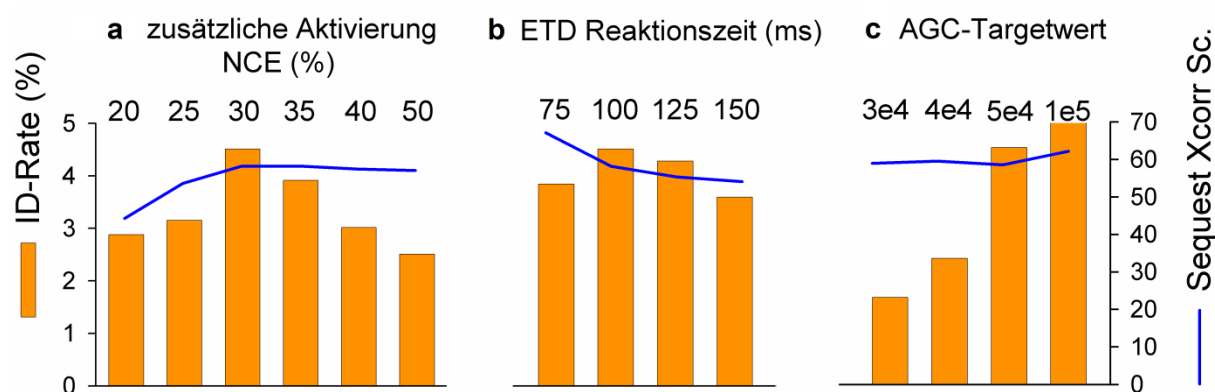


Abbildung 40: Durchschnittlicher Sequest Xcorr Score der identifizierten Peptide und Identifizierungsraten (ID-Rate) in Abhängigkeit der EThcD-Bedingungen.

(a) Die ETD-Reaktionszeit (ladungsabhängige ETD-Reaktionszeit, ca. 100 ms) wurde konstant gehalten und die zusätzliche Aktivierungsenergie (NCE) variiert. (b) EThcD-Fragmentierung wurde mit einer zusätzlichen Aktivierung von 30% und unterschiedlichen ETD-Reaktionszeiten durchgeführt. (c) EThcD-Spektren generiert mit 100 ms Reaktionszeit, 30% zusätzlicher Aktivierung und wechselnden AGC-Targetwerten.

3.2.5 Fragmentationsserien während EThcD

Bislang ist das Auftreten von b/c- und y/z-Ionenpaaren während der EThcD-Fragmentierung dokumentiert.²³⁸ Diese sogenannten „goldenen Dublette“ erhöhen die Zuverlässigkeit eine Phosphorylierungsstelle zu identifizieren. Zusätzlich zu diesen Fragmenten konnten für verschiedene Precursorionen a- und x-Fragmentationen detektiert werden. Ihre relative Abundanz reicht zwar nicht an die der zuvor beschriebenen Fragmente heran, dennoch sind sie durchaus dazu geeignet eine Phosphorylierungsstelle zu validieren. Exemplarisch dafür ist in Abbildung 41 das EThcD MS/MS-Spektrum des Peptides pLys5 dargestellt. Es zeigt eine beinahe lückenlose Serie von a-Ionen, inklusive der diagnostischen Fragmente a_2 und a_3 . In Kombination mit den Fragmentationen b_3 und c_3 bildet dies ein „goldenes Triplet“. Da das Spektrum zusätzlich die Fragmente y_7 und z_7 aufweist, verfügt es über fünf diagnostische Bruchstücke zur Bestimmung der Phosphorylierungsstelle. Demnach ist das dargestellte Spektrum meiner Kenntnis nach das erste, welches die Lokalisierung einer Phosphorylierungsstelle anhand von fünf verschiedener Ionenserien ermöglicht und ein „goldenes Triplet“ beinhaltet.

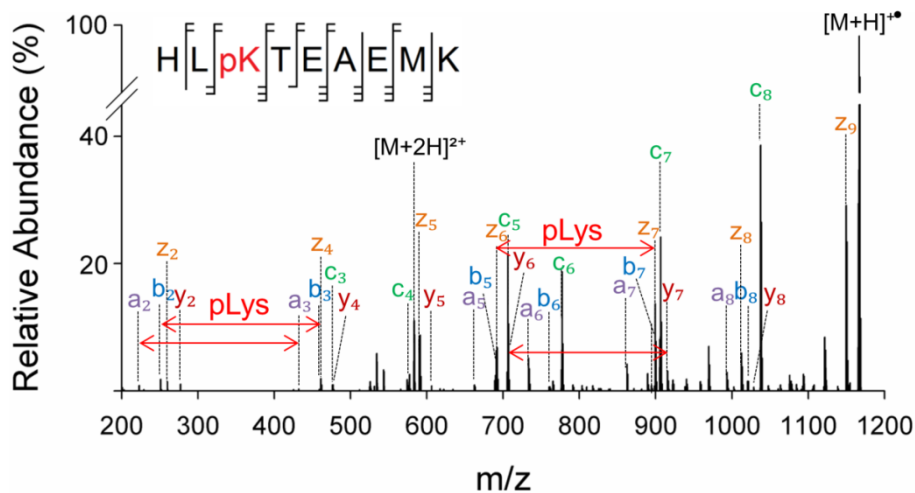


Abbildung 41: EThcD-Spektrum und Spaltungsmuster des Peptides pLys5.

Das Spektrum weist fünf verschiedene Ionenserien, inklusive der diagnostischen Fragmentationen a_3 , b_3 , c_3 , y_7 und z_7 auf. Die Anzahl der Haken repräsentieren die verschiedenen n - bzw. c -terminal identifizierten Fragmentationen.

Nachdem ausführlich dokumentiert wurde, dass EThcD datenreiche Spektren generiert, welche ein sicheres Fundament für die Beurteilung von labilen Peptidmodifikationen sind, werden in dem folgenden Abschnitt die gewonnenen Erkenntnisse zur Charakterisierung von labilen Modifikationen in Proteinen angewandt. Die zweifelsfreie Lokalisierung und Charakterisierung muss sich dabei nicht zwangsläufig auf endogene Modifikationen beschränken, auch die Begutachtung synthetisch eingeführter Modifikationen soll von Relevanz sein.

3.3 Charakterisierung von Proteinmodifikationen

Um die biologische Funktion einer PTM an einer bestimmten Position innerhalb eines Proteins untersuchen zu können, besteht ein großes Interesse daran Synthesestrategien zu entwickeln, die einen selektiven Einbau dieser Modifikation ermöglichen. Mit diesen Ansätzen ist es unter anderem möglich, PTM-bedingte strukturelle Veränderungen von Proteinen sowie deren Einfluss auf Protein-Protein-Interaktionen zu untersuchen. Vor diesem Hintergrund wurden in den Arbeitsgruppen von Prof. Fiedler und Prof. Hackenberger durch Dr. Marmelstein und Dr. Bhowmick verschiedene Synthesestrategien entwickelt, welche im Anschluss massenspektrometrisch charakterisiert wurden.

Neben der Analyse endogener Proteinmodifikationen sind auch artifizielle, d.h. synthetische eingeführte Modifikationen von Bedeutung. Als Beispiele sind die Installation von stabilen PTM-Analoga oder die Synthese sogenannter Antikörperwirkstoffkonjugate (ADC), wie sie durch Herrn Kasper im Labor von Prof. Hackenberger vorangetrieben wurden, aufzuführen. Hauptaugenmerk bei den Reaktionen gilt der Selektivität und der Ausbeute.

Verschiedene HPLC-MS-Verfahren sind ideale Werkzeuge um diese Kriterien zu überwachen und möglich Nebenreaktionen zu charakterisieren. Im ersten Schritt wird dazu in aller Regel das Protein in seiner intakten Form analysiert. Diese Analyse wird dazu genutzt, um den Umsatz der Reaktion abzuschätzen. Außerdem vermittelt sie meist einen ersten Eindruck über die Selektivität der Synthese. Im zweiten Schritt wird das Protein in einem *bottom-up*-Ansatz charakterisiert. Dieser liefert detailliertere Informationen über die Selektivität der Reaktion und erlaubt es, Nebenprodukte genau zu bestimmen. Im Folgenden werden die wichtigsten Aspekte beider Ansätze und den dazu im Zuge dieser Arbeit entwickelten Methoden diskutiert und anhand von drei Applikationsbeispielen deren Leistungsfähigkeit demonstriert.

3.3.1 HPLC-MS-Methode zur Charakterisierung intakter Proteine

Für die Analyse intakter Proteine wurde ein microLC-MS-Ansatz gewählt. Als Trennsäule kam eine wide-pore C₄-Säule zum Einsatz. Nach kurzer chromatographischer Trennung erfolgte die Ionisierung der Proteine mit Hilfe einer für diese Flussraten geeigneten Ionenquelle. Die Optimierung der verschiedenen Gasströme (Sheath, Aux & Sweep Gas) und insbesondere deren Erwärmung führten zu einer Steigerung der Empfindlichkeit des Systems. Zusätzlich wurde die Empfindlichkeit durch Erhöhung der Ionentransferkapillartemperatur verbessert.

Während sich Proteine mit einer molaren Masse von 10 kDa bis 15 kDa noch sinnvoll mit den herkömmlichen Druckverhältnissen in der Orbitrapzelle bestimmen lassen, empfiehlt es sich für größere Proteine in den Intaktproteinmodus zu wechseln. Dies hat zur Folge, dass der Druck in der Orbitrapzelle von $2,5 \times 10^{-10}$ auf $1,4 \times 10^{-10}$ Torr reduziert wird. Für die Analyse großer Moleküle ist dies von

Vorteil, da sich somit die freie Weglänge vergrößert und Kollisionen mit Gasmolekülen reduziert werden. Gleichzeitig verschlechtern sich jedoch die Trappingeigenschaften in der C-Trap, weil auch der Gasdruck für das Trapping reduziert wird.

Theoretisch lassen sich mit der HF-Orbitrapzelle Auflösungen von bis zu 500.000 bei m/z 200 erzielen. Praktisch lässt sich dies bei der Messung von Proteinen jedoch nicht realisieren, da eine Verdopplung der Auflösung stets mit einer Verdopplung der Messzeit einhergeht und sich der Intensitätsabfall bei der Erfassung großer Moleküle nicht über mehrere 100 ms verfolgen lässt. Die Bestimmung der Massen intakter Proteine erfolgte daher in der niedrigsten Auflösung ($R=15.000$). Die damit erzeugten MS-Spektren sind zwar nicht isotopenaufgelöst, anhand der Ladungsserien lassen sich jedoch deconvolierte Spektren mit einer ausreichenden Massengenauigkeit ≤ 50 ppm ableiten. Des Weiteren wurden für die Messung der m/z -Bereich auf 500-3000 erweitert und um das Signal-zu-Rauschverhältnis zu verbessern 10 Microscans für einen Scan akkumuliert.

Parallel zu diesen Entwicklungen wurde eine HPLC-MS-Methode zur Analyse von Proteinen auf einem Q-TOF-basierten System (Xevo™ G2-XS, Waters) etabliert. Nach der Optimierung der Quellenparameter wurden die Daten im sensitiven Modus bei einer Auflösung von $R=20.000$ und unter Berücksichtigung einer Lockmasse (m/z 556,2771, Leucinenkephalin) aufgezeichnet. Vergleichsmessungen zeigten, dass das Gerät über eine höhere Empfindlichkeit verfügte. Darüber hinaus wurden für die deconvolierten Spektren höhere Massengenauigkeiten von ca. 10 und maximal 20 ppm Abweichung erzielt. Die Anlage lässt sich ohne apparative Veränderungen nutzen, sodass alle weiteren Studien mit diesem Gerät erfolgten.

3.3.2 *Bottom-up*-Ansatz zur Charakterisierung von Proteinmodifikationen

Das MS^1 -Spektrum eines intakten Proteins liefert erste Informationen über die Art und Anzahl von Modifikationen, die an diesem gebunden sind. Die Lage der Modifikationen innerhalb des Proteins lässt daraus jedoch nicht ableiten, sodass die wichtigste Information über eine positionsspezifische Reaktion vorenthalten bleibt. Erkenntnisse darüber gewinnt man in einem *bottom-up*-Ansatz. Dazu werden die Proteine nach der Synthese allgemein in einem In-Gelverdau oder Lösungsverdau hydrolysiert und die gewonnenen Peptide mittels nanoLC-MS/MS analysiert. Oberstes Ziel dieser Methodik ist es, eine hohe Sequenzabdeckung zu erzielen, d.h. dass man möglichst alle entstandenen Peptide und deren Modifikationen identifiziert. In der Praxis ist dies äußerst selten der Fall. Faktoren welche die Sequenzabdeckungen beeinflussen sind unter anderem die Primärstruktur des Proteins oder die eingesetzte Protease. Außerdem schwanken das chromatographische Verhalten, die Ionisierungsfähigkeit und das Fragmentierungsverhalten der Peptide.

Die zu erwartende Komplexität des Proteingemisches ist in einem solchen Ansatz gering im Vergleich zu einer proteomischen Studie. Daher reichen kurze Gradienten (40-60 min Trennzeit) aus, um eine

ausreichende Trennung des Peptidgemisches zu erreichen. Um möglichst viele Peptide zu erfassen, werden kurze dynamische Ausschlusszeiten (30–40 s) gewählt. Diese ermöglichen es auch Positionsisomere modifizierter Peptide zu unterscheiden. Zusätzlich wird die Qualität der Daten durch relativ lange Injektionszeiten, hohe AGC-Targetwerte und eine hochaufgelöste Detektion auf MS¹ sowie MS²-Ebene erhöht.

In den vorangegangenen Kapiteln wurden die Vorzüge der EThcD-Fragmentierung bei der Identifizierung von labilen Modifikationen herausgestellt, sodass dies auch die Methode der Wahl bei der Charakterisierung der Proteine ist. Zusätzlich lässt sich noch die HCD-Fragmentierung in die datenabhängige Aufzeichnung einbinden, sodass man zum Teil komplementäre Informationen über ein Peptid erhält. Beide Techniken werden alternierend eingesetzt, wobei EThcD die höhere Priorität genießt. Die erzeugten Daten werden anschließend mit verschiedenen Suchmaschinen untersucht. Zu beachten ist hierbei, dass alle potentiellen Nebenreaktion abdeckt sind.

3.3.3 Charakterisierung einer pyrophosphorylierten Myoglobinmutante

Für die positionsspezifische Einführung einer Pyrophosphorylierung auf Proteinebene wurde von Marmelstein *et al.* eine Syntheseroute entwickelt.²⁷⁵ Diese beinhaltet eine zuvor positionsspezifisch eingeführte Phosphorylierung zu pyrophosphorylieren. Als Modellprotein wurde das Myoglobin des Pottwals (*Physeter catodon*) gewählt an dessen Position Asp-127 über ein *amber codon suppression system* eine Serinphosphorylierung eingeführt wurde.²⁷⁶ Diese Myo-D127pS-Mutante wurde im Anschluss mit verschiedenen Phosphorimidazoliden umgesetzt und die installierte Serinphosphorylierung kovalent mit einem weiteren Phosphatrest modifiziert (vgl. Abbildung 42).

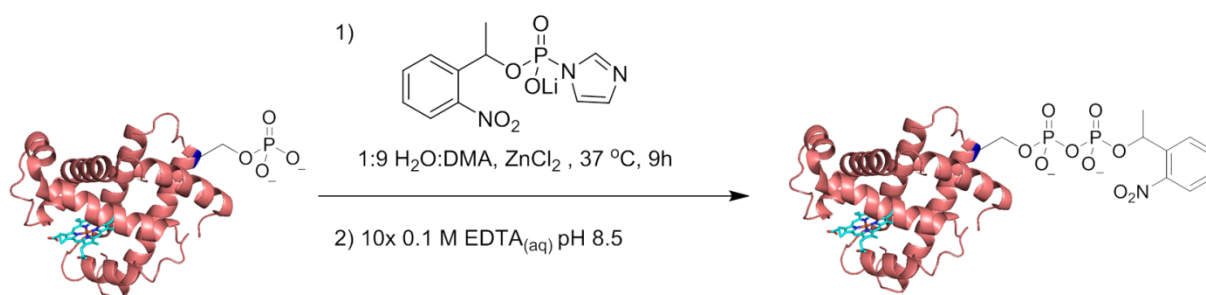


Abbildung 42: Pyrophosphorylierung von Myo-D127pS.

Die phosphorylierte Myoglobinmutante wird mit einem Phosphorimidazolid umgesetzt und die geschützte Proteinpyrophosphorylierung erhalten.

Das Reaktionsprodukt, eine geschützte Proteinpyrophosphorylierung, ließ sich mittels HPLC-MS charakterisieren. Nach der Dekonvolution erhielt man ein Signal mit einer Masse von 18576,2 Da, welcher nur ca. 1 Da von der theoretischen Masse abweicht. Darüber hinaus fanden sich weitere Signale

in Abständen von ca. 170 Da, welche durch Nebenreaktionen hervorgerufen wurden (vgl. Abbildung 43).

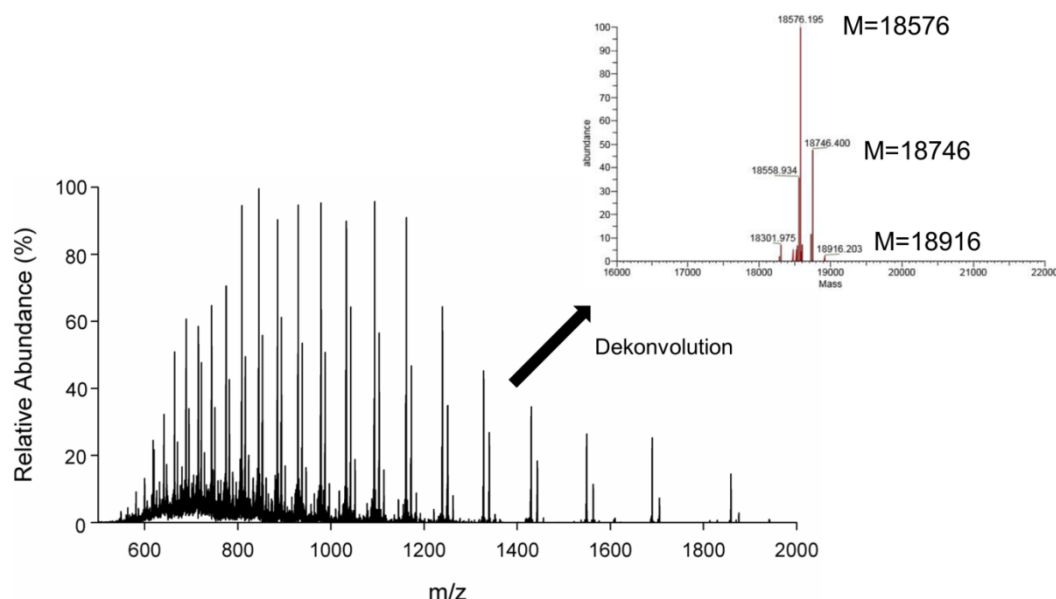


Abbildung 43: HPLC-MS Analyse der intakten pyrophosphorylierten Myoglobinmutante.

Das MS¹ Spektrum des intakten Proteins zeigt drei verschiedene Ladungsseries, welche nach der Dekonvolution als die korrekte Masse (M=18576) und zwei verschiedener Nebenprodukte mit Massendifferenzen von ca. 170 Da identifiziert werden.

Zur Beurteilung der Selektivität der Reaktion wurde ein *bottom-up*-Ansatz durchgeführt. Dazu wurde die photospaltbare Schutzgruppe durch Einstrahlung von Licht abgespalten. Das freigesetzte pyrophosphorylierte Protein wurde danach alkyliert, mit Trypsin verdaut und mittels nanoLC-MS/MS analysiert (vgl. Abbildung 44a).

Mit diesem Ansatz ließ sich eine adäquate Sequenzabdeckung erzielen, die korrekte Pyrophosphorylierung eindeutig nachweisen und Nebenreaktionen präzise eingrenzen (vgl. Abbildung 44b). So konnte gezeigt werden, dass auch weitere nukleophile Seitenketten wie Histidin, Lysin, Serin und Threonin während der Reaktion zu einem geringen Anteil phosphoryliert werden. Zusätzliche Pyrophosphorylierungen wurden nicht erkannt. Hervorzuheben ist, dass in drei Fällen eine labile Phosphorylierung in direkter Nachbarschaft zu einer Serin oder Threoninphosphorylierung nachgewiesen wurde. Dies untermauert noch einmal die herausragenden Eigenschaften der EThcD-Fragmentierung, die eine lückenlose Sequenzabdeckung unter Erhalt labiler Modifikationen ermöglicht. Die dazugehörigen PSMs sind dem Anhang zu entnehmen. Außerdem sind für die Unterscheidung der zum Teil isobaren Phosphopeptide eine gute chromatographische Trennung und kurze dynamische Ausschlusszeiten nötig.

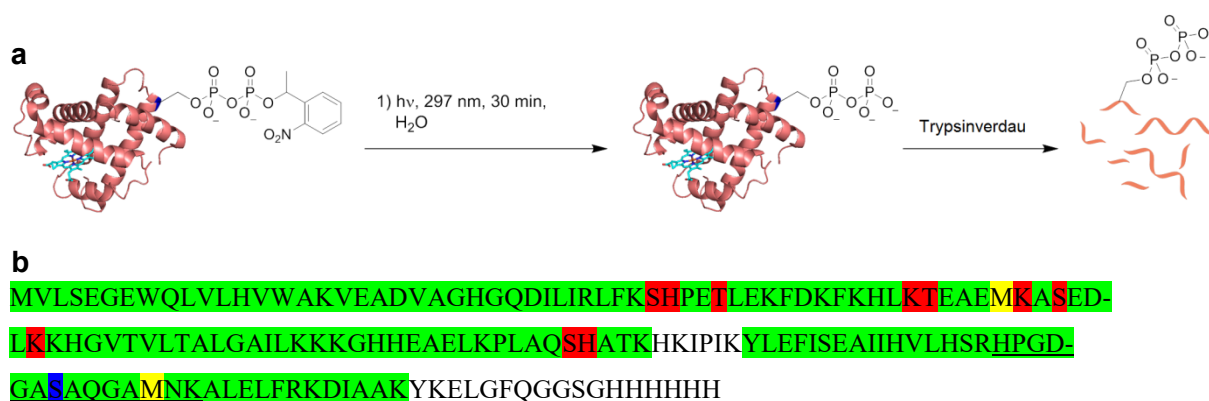


Abbildung 44: Charakterisierung der Reaktionsprodukte mittels *bottom-up*-Ansatz.

(a) Nach selektiver Pyrophosphorylierung der Myoglobinmutante Myo-D127pS, anschließender Entschützung mittels Bestrahlung erhält man Myo-D127ppS, welches mit Trypsin hydrolysiert wird. (b) Ermittelte Sequenzabdeckung: Die grün unterlegten Sequenzabschnitte repräsentieren identifizierte Abschnitte des Proteins. Rot hervorgehobene Aminosäuren stellen Nebenreaktionen dar. Gelb markierte Methioninreste sind oxidiert. Die korrekte Pyrophosphorylierungsstelle an Position Ser-127 wurde Blau hervorgehoben und die relevante Peptidsequenz unterstrichen.

Die langen Injektionszeiten und hohen Targetwerte der *bottom-up*-Proteomik Methode ermöglichten es, informative Fragmentationenspektren zu erzeugen. Das Peptid, welches die gewünschte Pyrophosphorylierungsstelle an Position Ser-127 trägt, wurde als dreifach geladenes Precursorion fragmentiert. Das entsprechende Fragmentationenspektrum deckt die Sequenz des Peptides lückenlos ab und weist die Pyrophosphorylierung anhand von drei verschiedenen Ionenserien nach. Bemerkenswert ist, dass neben den üblichen b-, c-, y- und z-Ionen auch a- und x-Fragmentationen in dem Spektrum enthalten sind (vgl. Abbildung 45).

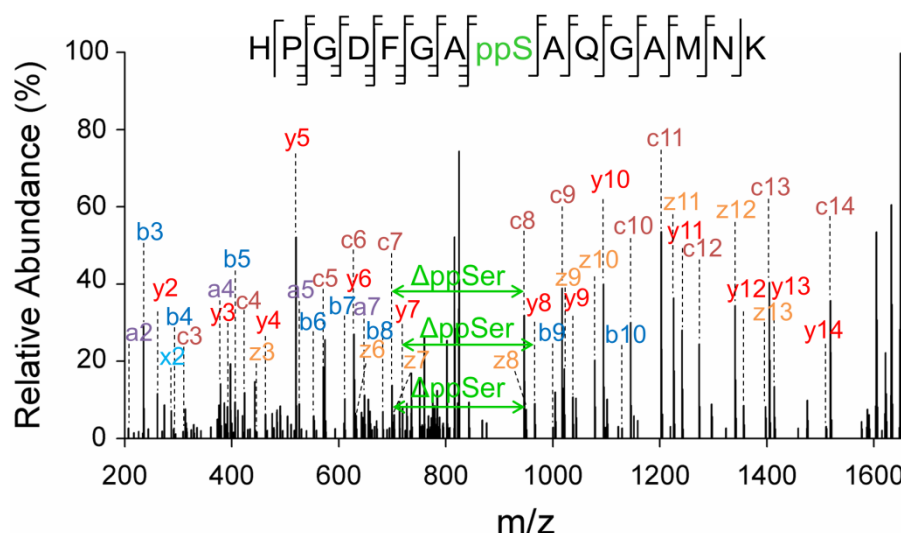


Abbildung 45: Nachweis der positionsspezifischen Pyrophosphorylierung von Myo-D127ppS.

Das aus dem *bottom-up*-Ansatz stammende Peptid HPGDFGAppSAQGAMNK ist nach der ESI dreifach positiv geladen. Das entsprechende ETHCD-Spektrum weist eine lückenlose Sequenzabdeckung auf. Die Pyrophosphorylierungsstelle wird anhand der diagnostischen Fragmente c_8 , y_8 und z_8 zweifelsfrei lokalisiert. Neben den üblichen b-, c-, y- und z-Ionen treten auch a- und x-Ionen auf.

3.3.4 Charakterisierung einer cysteinphosphorylierten Angiogeninmutante

Nach der erfolgreichen chemoselektiven Synthese von Cysteinphosphorylierungen auf Peptidebene wurde im Labor von Prof. Hackenberger dazu übergegangen, diese labile Modifikation auf Proteinebene zu installieren.⁶¹ Als Modellprotein wurde von Dr. Bhowrick eine Mutante des Angiogenins (ANG), an dessen Position Ser-87 ein Cysteinrest eingebaut wurde, verwendet.²⁷⁷ Neben den zahlreichen weiteren Funktionalitäten auf dem Protein bestand die besondere Herausforderung darin, selektiv die Position Cys-87 zu phosphorylieren ohne einen der weiteren sechs Cysteinreste zu modifizieren. Als erstes wurde dazu das freie Thiol des Cysteins mit Ellman's Reagenz unter Bildung eines elektrophilen Disulfides umgesetzt. Dieses aktivierte Ellman's-disulfid wurde von nukleophilen Phosphiten unter Erhalt der entsprechenden Phosphothiolatester angegriffen. Als letztes werden die photolabilen Phosphodiester durch Bestrahlung mit UV-Licht abgespalten und die native Cysteinphosphorylierung freigesetzt (vgl. Abbildung 46).

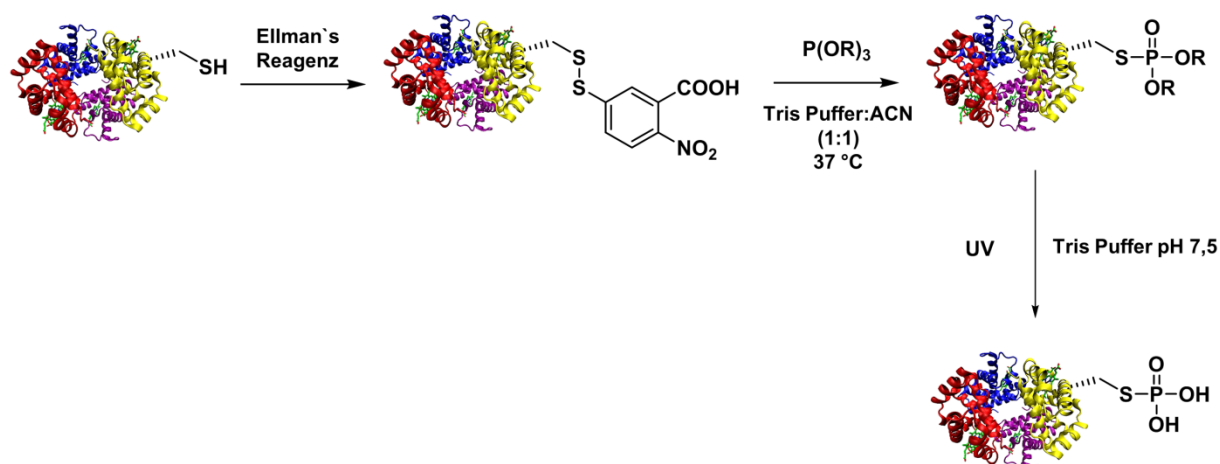


Abbildung 46: Positionsspezifische Synthese von Cysteinphosphorylierungen.

Das freie Thiol wird mittels Ellman's Reagenz aktiviert. Das gebildete elektronenarme Disulfid wird mit nukleophilen Phosphaten unter Bildung von Phosphothiolesteren umgesetzt. Die native Cysteinphosphorylierung wird durch Abspaltung der Diester mit UV-Licht erhalten.

In Abbildung 47 ist das dazugehörige dekonvolvierte Spektrum, des Syntheseansatzes, dargestellt. Dieses zeigt das unmodifizierte Protein ($M=14283$) mit einer relativen Abundanz von ca. 45%. Der Basispeak des Spektrums weist eine Massendifferenz von +80 Da auf. Dies entspricht exakt der Masse einer Phosphorylierung. An welcher Position diese zusätzliche Modifikation angeheftet wurde, lässt sich daraus jedoch nicht ableiten. Ein weiteres Signal, welches eine Massendifferenz von 160 Da aufwies, wurde nicht erfasst, sodass Mehrfachphosphorylierungen, die ein Hinweis auf Nebenreaktionen wären, ausgeschlossen werden konnten.

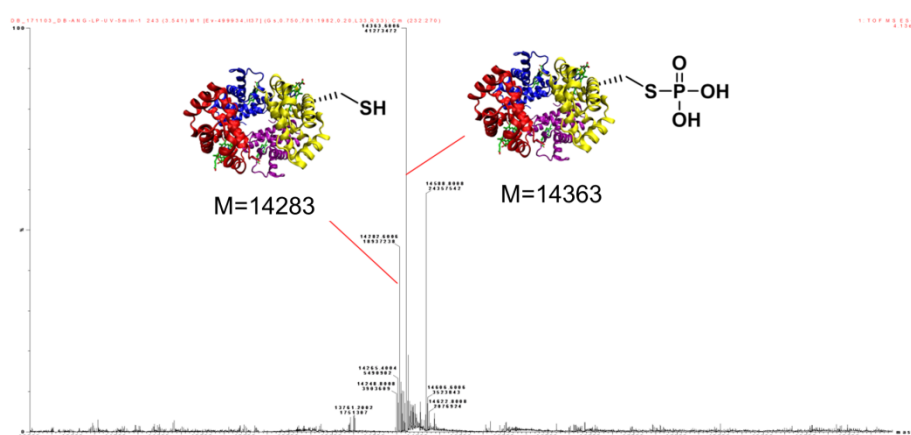


Abbildung 47: Dekonvolviertes Spektrum eines Syntheseansatzes zur positionsspezifischen Cysteinphosphorylierung einer Angiogeninmutante.

Hervorgehoben sind die unmodifizierte Mutante und die einfach phosphorylierte Spezies. Weiterführende Studien belegten die korrekte Modifizierung am Cysteinrest.

Darüber hinaus wurde ein Peak mit einer relativen Abundanz von ca. 55% und einer Masse von 14589 Da bestimmt, welche möglicherweise ein Glutathionaddukt darstellt. Dies gilt es bei der Bestimmung der Ausbeute zu Berücksichtigen.

Nach den vielversprechenden Ergebnissen der Intaktproteinanalyse wurde dazu übergegangen das Protein mittels *bottom-up*-Proteomik zu untersuchen. Wie bereits in Kapitel 3.1.3 ausführlich diskutiert, ist die EThcD-Fragmentierung prädestiniert für die Identifizierung von labilen Cysteinphosphorylierungen, eine Eigenschaft, die bei dieser Fragestellung besonders zum Tragen kam. Galt es doch zu klären, ob möglicherweise weitere Cysteinreste unspezifisch modifiziert wurden. Der Abbildung 48 ist zu entnehmen, dass eine akzeptable Sequenzabdeckung von über 80% erzielt und fünf der sechs weiteren Cysteinreste abgedeckt wurden.

MQDNSR YTHFLTQH YDAKPQGRDD R YCESIMR R RGLTSP CKDINTFIHG NKR SIKAI CEN-
K NGNPHRENLRISKSSFQVTT CKLHGG CPWPP COYR ATAGFR NVVVA CENGLPVVHHDQSIFR RP

Abbildung 48: Charakterisierung der Reaktionsprodukte nach selektiver Cysteinphosphorylierung der Agiogeninmutante Ang-S87C mittels *bottom-up*-Ansatz.

Ermittelte Sequenzabdeckung: Die grün unterlegten Sequenzabschnitte repräsentieren identifizierte Abschnitte des Proteins. Rot hervorgehoben ist die Tyrosinsulfatierung. Gelb markierte Methioninreste sind oxidiert. Rosa gekennzeichnete Cysteinreste sind cam-modifiziert. Die korrekte Cysteinphosphorylierungsstelle an Position C87 wurde Blau hervorgehoben und die relevante Peptidsequenz unterstrichen.

Keiner dieser Reste trug eine Cysteinphosphorylierung. Im Gegenteil, die im Zuge der Probenvorbereitung erfolgende Alkylierung von Cysteinresten mit Iodacetamid, konnte mehrheitlich nachgewiesen werden. Um andere Nebenreaktionen auszuschließen wurden weitere Aminosäurereste in die datenbankgestützte Suche aufgenommen. Dies führte zur Identifizierung einer angeblichen Tyrosinphosphorylierung an Position Tyr-25. Dieses Ergebnis war zu Beginn nicht schlüssig da keine weiteren hydroxylfunktiontragenden Aminosäuren modifiziert waren. Eine genauere Betrachtung der Massengenauigkeit zeigte allerdings, dass das Precursorion (m/z 720,7631) des dazugehörigen Peptides eine relativ hohe Massenabweichung von ungefähr -6,5 ppm aufwies, unter Verwendung der EASY-IC-Funktion werden jedoch Massengenauigkeiten ≤ 2 ppm erreicht. Zusätzlich hatte der überwiegende Teil der während dieser Messung identifizierten Peptide eine Massenabweichung ≤ 1 ppm, sodass möglicherweise eine andere Modifikation an dem Tyrosin gebunden war. Aufgrund der etwas niedrigeren Masse der Sulfatierung ($M=79,9568$) gegenüber der Phosphorylierung ($M=79,9663$) wurde das entsprechende m/z -Verhältnis (m/z 720,7632) berechnet. Daraus ergab sich eine Massendifferenz von 0,1 ppm, sodass abschließend von einer Tyrosinsulfatierung, einer endogenen PTM, ausgegangen wurde.²⁷⁸ Die ursprünglich falschpositive Zuordnung ergab sich aus dem in der Datenbanksuche zugelassenen Massenfehler von ± 10 ppm für Precursorionen. Aufgrund der hohen Massengenauigkeit mo-

derer Massenspektrometer ist an dieser Stelle der Einsatz geringerer Differenzen von 5-6 ppm geeigneter. Da die Sulfatierung ebenfalls einen Massenshift von 80 Da auf Proteinebene hervorruft, muss dies bei der Beurteilung der Ausbeute berücksichtigt werden.

Unabhängig davon konnte die Phosphorylierung der Angiogeninmutante an Position Cys-87 bestätigt werden. Die entsprechende Peptidsequenz stellt eine besondere Herausforderung für die Tandemmassenspektrometrie dar. Sie beinhaltet drei Prolinreste, welche sich in unmittelbarer Nachbarschaft zueinander befinden. Bindungsbrüche derartiger Sequenzabschnitte treten nur äußerst selten während ETD auf. Mit Hilfe der zusätzlichen HCD-Aktivierung gelang es jedoch, die entsprechenden Ionen der y-Serie zu detektieren. Für die zweifelsfreie Lokalisierung der Cysteinphosphorylierung relevante Fragmente stellen die unmodifizierten Fragment b_2 und c_4 , welche eine Phosphorylierung des Histidins an Position 2 ausschließen, sowie die Phosphorylierung tragenden Fragmente c_6 und c_7 dar. Phosphorylierungen des Tyrosins am C-Terminus des Peptides und des Iodacetamid-modifizierten Cysteins an Position 10 können anhand der Fragmente z_4 , y_5 , y_6 und z_7 ausgeschlossen werden (vgl. Abbildung 49).

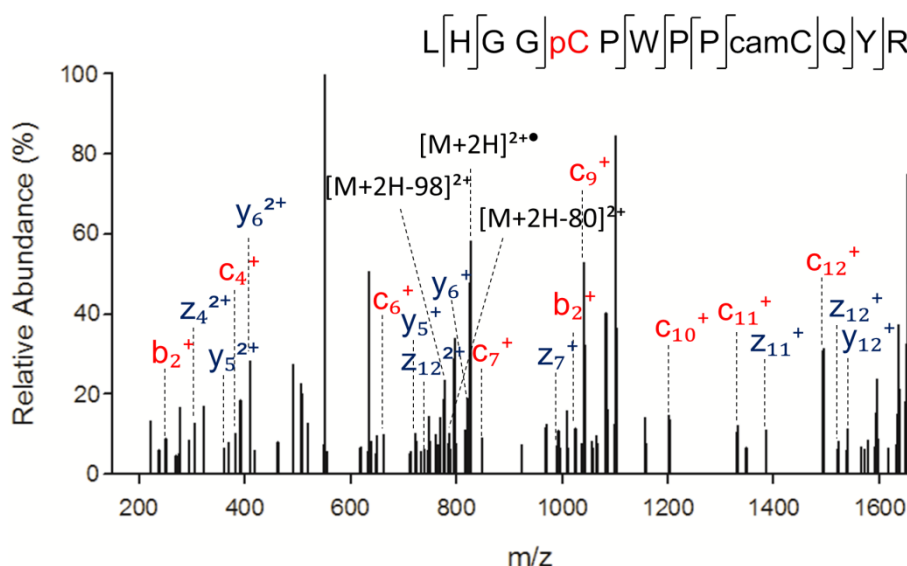


Abbildung 49: Nachweis der positionsspezifischen Cysteinphosphorylierung von Ang-S87pC.

Das aus dem *bottom-up*-Ansatz stammende Peptid LHGGpCPWPcamCQYR ist nach der Elektrospray-ionisation dreifach positiv geladen. Das entsprechende ETHCD-Spektrum weist eine ausreichende Sequenzabdeckung auf, um die Cysteinphosphorylierung an Position 5 zweifelsfrei zu belegen.

3.3.5 Charakterisierung von Antikörper-Wirkstoff-Konjugaten

Antikörper-Wirkstoff-Konjugate stellen eine vielversprechende Klasse von Biopharmazeutika zur Behandlung verschiedener Krebsformen dar. Sie bestehen aus einem Antikörper an den über einen Linker ein Wirkstoff (meist ein Toxin) gebunden ist. Der Antikörper ist in der Lage spezifisch an ein Antigen, welches sich nur auf der Oberfläche der Zielzelle befindet, zu binden, sodass der Wirkstoff mit hoher Spezifität die erkrankte Zelle erreicht.²⁷⁹⁻²⁸¹ Nach diesem Prinzip lässt sich die Effizienz eines Wirkstoffes steigern und mögliche Nebenwirkungen minimieren. Eine besondere Schwierigkeit bei der Entwicklung und Synthese von ADCs stellt die zuverlässige und selektive Anbindung des Toxins an den Antikörper dar.²⁸² Aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften und ihrer relativ geringen natürlichen Häufigkeit innerhalb des Proteins werden gezielt Cysteinreste für die Modifikation herangezogen. Somit lassen sich ideale Verhältnisse zwischen Wirkstoff und Antikörper (DAR) erzeugen. Für die selektive Anbindung wurde von Kasper *et al.* eine Reaktionskaskade entwickelt. Im ersten Schritt werden dazu in einer chemoselektiven Staudinger-Phosphonitreaktion elektronenreiche Alkinphosphonite mit Aziden zu elektronenarmen Alkinphosphonamidaten zur Reaktion gebracht. Die erzeugten Phosphonamidate weisen eine hohe Selektivität gegenüber Thiolgruppen auf und lassen sich in wässrigen Systemen zu relativ stabilen Cysteinphosphoamidaten umsetzen. Dieser Ansatz wurde dazu genutzt um an den Antikörper Trastuzumab, dessen Interketten-Disulfidbrücken zuvor reduziert worden waren, über einen Cathepsin B-spaltbaren Linker ein Toxin zu binden. Die Struktur der Modifikation (M=1372,6 Da) ist in Abbildung 50 dargestellt. Zur Vereinfachung wird diese im Folgenden schematisch dargestellt.

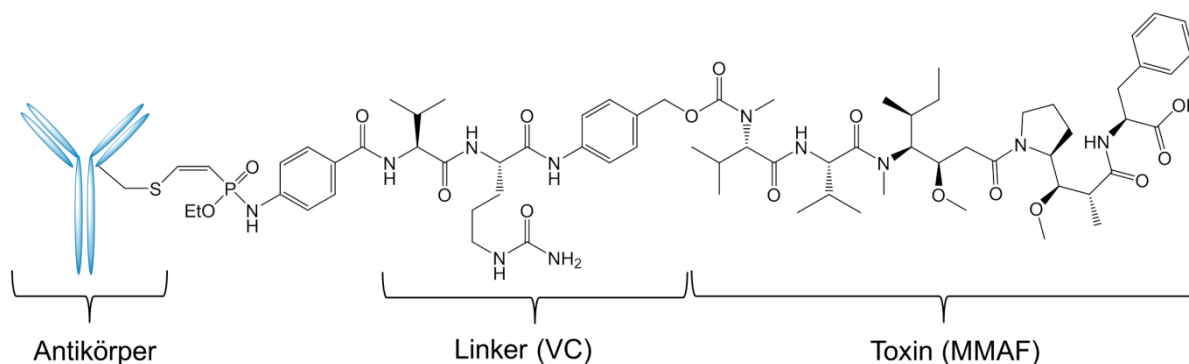


Abbildung 50: Schematische Darstellung der Struktur des alkinphosphonamidatbasierten ADCs.

Der Antikörper Trastuzumab wurde mit Hilfe eines Phosphonamidates über den Cathepsin B-spaltbaren Dipeptidlinker Val-Cit (VC) mit dem antimitotischen Wirkstoff Monomethylauristatin-F (MMAF) verknüpft.

Nach der chemoselektiven Modifizierung von Trastuzumab wurde das Produkt mittels LC-MS analysiert. Zur Vereinfachung der Spektren wurden zu Beginn die auf dem Antikörper befindlichen Zuckerreste mit Hilfe des Enzyms PNGase-F abgespalten. Das dazugehörige Chromatogramm weist drei wesentliche Peaks auf (vgl. Abbildung 51a). Dieses Ergebnis entspricht den Erwartungen, da mit der leichten Kette (Peak 1) und der schweren Kette (Peak 3) des Antikörpers sowie dem Enzym PNGase-F

(Peak 2) drei Hauptproteinkomponenten in dem Reaktionsgemisch enthalten waren. Bei genauerer Betrachtung erkennt man bereits, dass sich die Peaks 1 und 3 aufsplitten oder Schultern aufweisen und somit ein Gemisch aus verschiedenen Modifizierungsvarianten andeuten. Um möglichst alle in dem Produktgemisch enthaltenen Untereinheiten und deren Modifizierungen sicher unterscheiden zu können, wurden für die Dekonvolution einzelne kurze Intervalle des Chromatogramms von maximal 20 s Länge integriert. Die somit erzeugten MS¹ Übersichtsspektren wiesen eine geringere Komplexität auf und beinhalteten wenige Ladungsserien. In Abbildung 51 sei dies an einem konkreten Beispiel demonstriert. Integriert man die zweite Peakhälfte des Peaks 3 so erhält man ein Übersichtsspektrum, welches von einer Ladungsserie dominiert wird. Nach der Dekonvolution wird damit eine Masse von 53235 Da ermittelt. Da die unmodifizierte schwere Kette (SK) von Trastuzumab eine Masse von ca. 49118 Da hat, lässt sich daraus ableiten, dass diese dreifach modifiziert vorliegt.

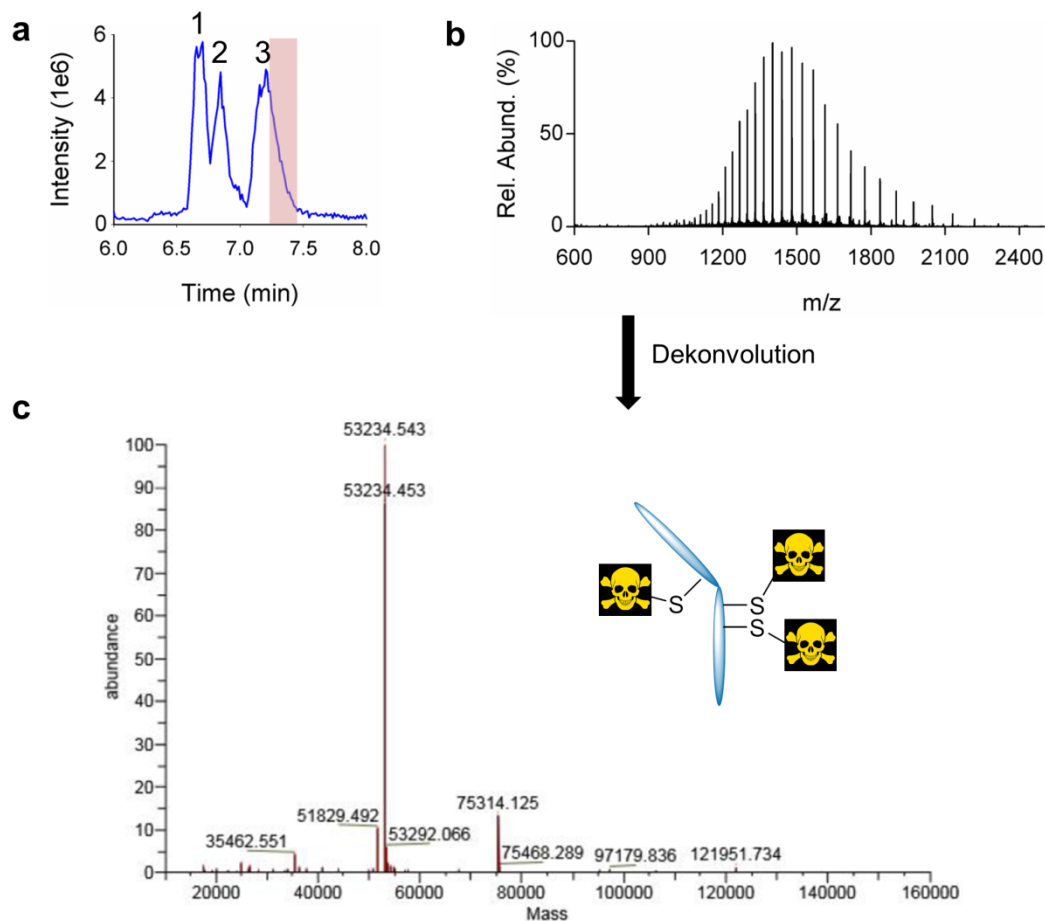


Abbildung 51: Identifizierung von Antikörper-Wirkstoff-Konjugatuntereinheiten mittels HPLC-MS.

(a) TIC der HPLC-MS Analyse. Das Chromatogramm zeigt drei Hauptkomponenten (1=leichte Kette, 2=PNGase-F & 3=schwere Kette), die sich in weitere Varianten untergliedern. Der für die Erzeugung des MS¹ Spektrums genutzte Bereich ist rot hervorgehoben. (b) MS¹ Übersichtsspektrum, das geprägt ist von einer Ladungsserie. (c) Dekonvoliertes Spektrum, welches sich der dreifach modifizierten schweren Kette zuordnen lässt.

Mit dieser Herangehensweise wurden weitere Konjugatuntereinheiten und deren Modifizierungen identifiziert. So konnte gezeigt werden, dass die leichte Kette (LK) maximal eine Modifizierung erfuhr und die schwere Kette des Antikörpers einfach, zweifach und dreifach modifiziert wurde. Diese Beobachtung ist von besonderem Interesse, da Trastuzumab über zwei Interketten-Disulfidbrücken zwischen den schweren Ketten, einer Disulfidbrücke zwischen der leichten und der schweren Kette und acht Intraketten-disulfidbrücken verfügt. Das Ergebnis legt nahe, dass der Antikörper während der Synthese ausschließlich an den Cysteinen der Interketten-Disulfidbrücken der leichten und der schweren Kette modifiziert wird und die Intraketten-Disulfidbrücken intakt bleiben. Abschließend lässt sich dies jedoch nur anhand der *bottom-up*-Proteomik klären.

Um das DAR, ein wichtiges Kriterium bei der Charakterisierung eines Antikörperwirkstoffkonjugates, zu bestimmen, wurden alle Signale des Chromatogramms gleichzeitig integriert (vgl. Abbildung 52).

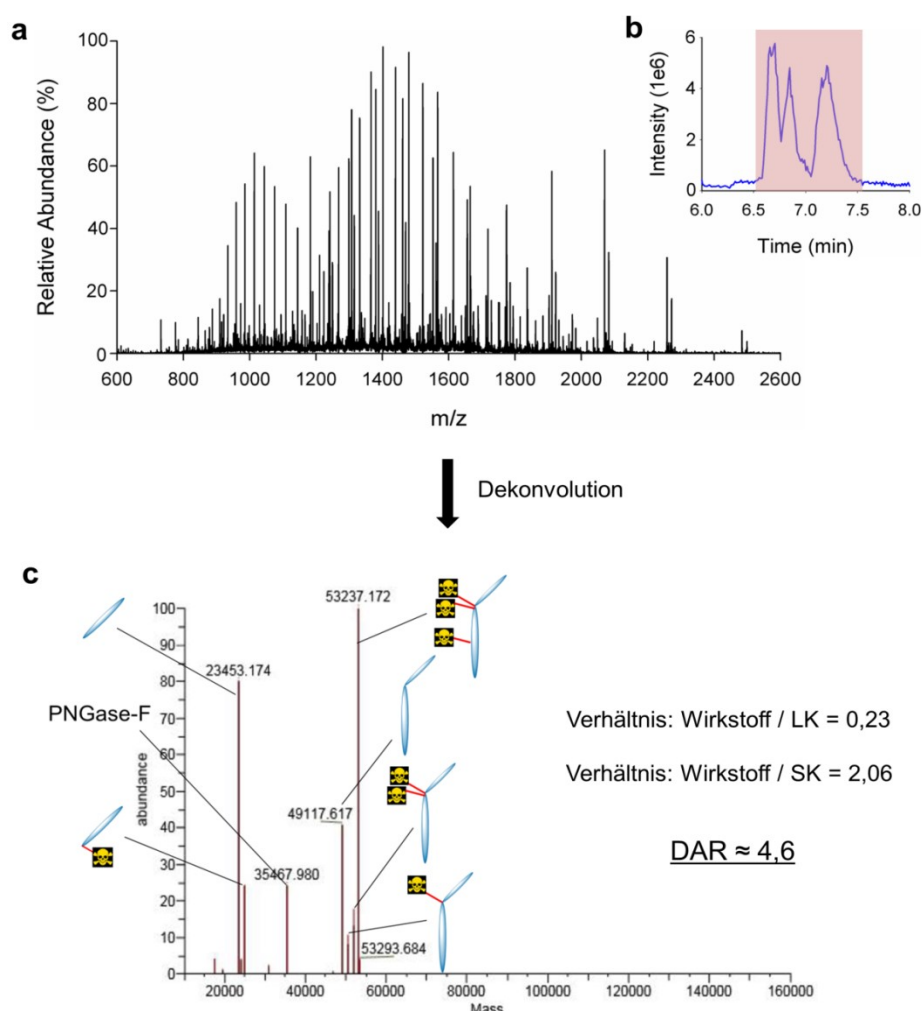


Abbildung 52: Bestimmung des Antikörper-Wirkstoff-Verhältnisses (DAR).

(a) MS¹ Übersichtspektrum aller enthaltenen Proteine. (b) TIC der HPLC-MS Analyse. Der für die Erzeugung des MS¹ Spektrums genutzte Bereich ist rot hervorgehoben. (c) Dekonvoliertes Spektrum mit den Antikörperuntereinheiten (LK & SK) und deren Modifikationen. Aus den relativen Abundanzen lassen sich Verhältnisse zwischen Wirkstoff und Untereinheit ableiten. Diese bilden die Basis für die Berechnung des DARs.

Das daraus resultierende MS¹-Spektrum zeigt erwartungsgemäß diverse sich überlappende Ionenserien der verschiedenen Proteine und deren Modifikationen. Bemerkenswerterweise ergab die Dekonvolution dieses komplexen Spektrums dennoch ein sinnvolles Ergebnis. So wurde deutlich, dass ca. ein Fünftel der leichten Kette einfach modifiziert ist, während die schwere Kette im Mittel zwei Modifikationen trägt, wobei die dreifache Modifizierung der häufigste Zustand darstellte. Anhand dieser Daten wurde abschließend für diesen Syntheseansatz ein DAR von ca. 4,6 ermittelt.

Die relativen Abundanzen des dekonvolvierten MS¹-Spektrums waren bereits ein Indiz für eine relativ hohe Selektivität der Reaktion. Bei einer unselektiven Reaktion würde man eine größere Anzahl an addierten Resten erwarten, wobei die relative Häufigkeit mit steigender Anzahl an Modifikationen sinkt. In diesem Fall umfasst die Verteilung jedoch eine Modifizierung pro leichter Kette und maximal drei pro schwerer Kette. Obwohl zahlreiche weitere Funktionalitäten auf beiden Untereinheiten zur Verfügung stehen, konzentriert sich die Modifizierung mit dem sterisch anspruchsvollen Rest auf einige wenige Positionen, diese galt es mittels *bottom-up*-Proteomik zu identifizieren.

Um die Selektivität der Reaktion zu demonstrieren, wurde ein weiteres Alkinphosphonamidat mit Trastuzumab umgesetzt und der Antikörper verdaut. Die Charakterisierung des modifizierten Antikörpers bestätigte und präzierte die Ergebnisse der Intaktproteinanalyse. So konnte gezeigt werden, dass eine Modifizierung mit Hilfe des Phosphonamidates ausschließlich an Cysteinresten von staten geht. Obwohl zahlreiche weitere Aminosäuren (H, K, R, S, T & Y) als potentielle Modifizierungsstellen zur Verfügung stehen, gelang der Nachweis des Phosphonamidates nur für Cystein. Anhand der Sequenzabdeckung der leichten Kette Trastuzumabs sei dies illustriert (vgl. Abbildung 53). Diese beträgt über 90% und weist nur drei kleine Lücken, resultierend aus sehr kurzen tryptischen Peptiden, auf. Damit ist für einen Verdau mit Trypsin die optimale Sequenzabdeckung erreicht, da sich die restlichen drei Peptide kaum massenspektrometrisch erfassen lassen.

DIQM TQSPSSLSASVGDRVIT C RASQDVNTAVAWYQKPGKAPKLLIYSASFLY-
SGVPSR FSGSR SGTDFTLTISSLQPEDFATYY C QQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAP-
SVFIPPSDEQLKSGTASVV C LLNIFYPR EAK VQWKVDNALQSGNSQESV-
TEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C

Abbildung 53: Charakterisierung der modifizierten, leichten Kette Trastuzumabs.

Ermittelte Sequenzabdeckung: Die grün unterlegten Sequenzabschnitte repräsentieren identifizierte Abschnitte des Proteins. Gelb markierte Methioninreste sind oxidiert. Rosa gekennzeichnete Cysteinreste sind cam-modifiziert. Die korrekte Cysteinmodifikation an Position Cys-214 wurde Balu hervorgehoben und die relevante Peptidsequenz unterstrichen.

Um auch diese Sequenzabschnitte abzudecken, müsste man auf eine unspezifischere Protease zurückgreifen oder zusätzlich eine Protease mit komplementärer Selektivität zu Trypsin verwenden. Für die Charakterisierung der leichten Kette spielte dies jedoch keine Rolle, da zuverlässig gezeigt werden

konnte, dass die LK ausschließlich am C-Terminus des Proteins modifiziert wird. Alle weiteren vier Cysteinreste wurden im Zuge der Probenvorbereitung ausschließlich alkylert und tragen demzufolge kein Phosphonamidatrest.

Herauszustellen ist, dass es sich bei der Aminosäuresequenz, welche die synthetische Modifizierung trug, um ein relativ kurzes, doppelt geladenes Peptid handelte. Darüber hinaus erfolgte die Modifizierung am C-Terminus in Abwesenheit einer basischen Aminosäure (K & R), sodass dieses labil modifizierte Peptid eine besondere Herausforderung für die Tandemmassenspektrometrie darstellte. Dank der optimierten EThcD-Fragmentierungsbedingungen für doppelt geladene Precursorionen gelang trotzdem die Aufzeichnung eines Fragmentspektrums, welches die Position zweifelsfrei belegt (vgl. Abbildung 54). Darüber hinaus wurde von dem Peptid auch ein HCD-Spektrum gemessen, welches zusätzlich die korrekte Lage der Modifikation bestätigt (siehe Anhang).

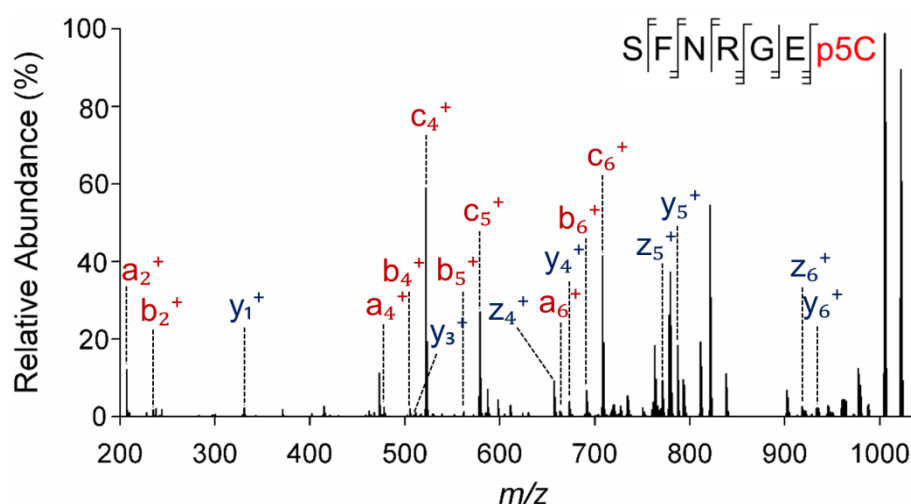


Abbildung 54: Lokalisierung des Cysteinphosphonamides auf der leichten Kette mittels EThcD.

Das Spektrum weist eine lückenlose Sequenzabdeckung mit diversen diagnostischen Fragmenten, wie z.B. y_1 , auf.

Für die schwere Kette Trastuzumabs konnte eine akzeptable Sequenzabdeckung von 65% erreicht werden. Diese erlaubte es zwei Modifizierungsstellen innerhalb der Gelenkregion (*hinge region*) an den Positionen Cys-230 und Cys-233 zu einzugrenzen. Dies ist der entscheidende Nachweis dafür, dass die Modifizierung der Cysteine ausschließlich an den Interketten-Disulfidbrücken des Antikörpers erfolgt und die Ergebnisse des *bottom-up*-Proteomik Ansatzes im Einklang mit den Intaktproteinmessungen stehen. Die für die strukturelle Integrität des Antikörpers relevanten Intraketten-Disulfidbrücken sind von der Modifizierung nicht betroffen.

3.3.6 Top-down-Ansatz zur Charakterisierung von Myoglobin

Die vorangegangenen Beispiele haben gezeigt, dass sich synthetisch eingeführte Proteinmodifikationen mit Hilfe von Intaktprotein-MS und *bottom-up*-Analysen zuverlässig charakterisieren lassen. Jedoch ist diese Form des Reaktionsmonitorings mit einem relativ großen Arbeitsaufwand verbunden. Die *Top-down*-Proteomik könnte in diesem Fall eine sinnvolle Alternative darstellen. Da die Sequenzierung bereits auf Proteinebene erfolgt, würden zahlreiche Probenvorbereitungsschritte, wie z.B. die Gelelektrophorese, die Reduktion, die Alkylierung und der tryptische Verdau der Proteine entfallen. Dies würde den Arbeitsaufwand reduzieren und gleichzeitig das Risiko des Verlustes labiler Modifikationen im Zuge der Probenpräparation senken. Darüber hinaus sind Proteine aufgrund ihrer hohen Ladungszustände nach der ESI prädestiniert für ETD-basierte Fragmentierungstechniken.

Um das Potential dieses Ansatzes zu untersuchen, wurden verschiedene Tandem-MS Experimente mit dem Protein Myoglobin durchgeführt und die jeweiligen Fragmentierungsparameter optimiert. Es zeigte sich, dass ab einer Auflösung von 60.000 isotopenaufgelöste Spektren des ca. 17 kDa großen Proteins möglich waren, sodass einzelne Precursorionen einer Fragmentierung unterzogen werden konnten. Für eine ausreichende Ionentransmission, wurde für den Quadrupol ein relativ weites Isolationsfenster von m/z 3 Da angewandt. Für die Fragmentierung wurden verschiedene Ladungszustände zwischen $z=17$ und $z=19$ gewählt. Die entsprechenden Spektren weisen eine hohe Komplexität auf, da Fragmentionen unterschiedlicher Ladungsreihen erzeugt werden (vgl. Abbildung 55).

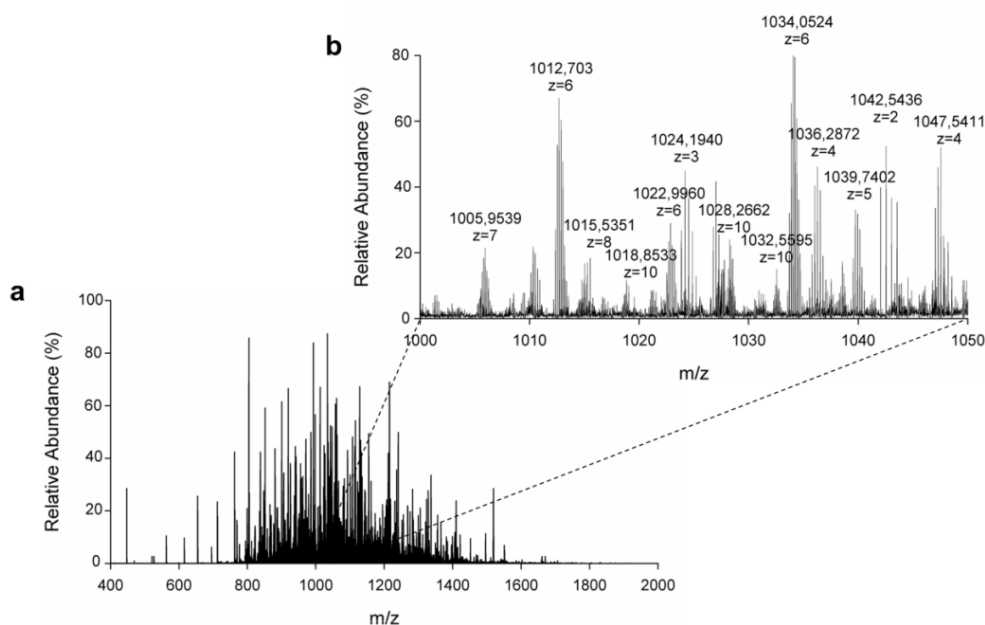


Abbildung 55: *Top-down*-Ansatz zur Charakterisierung von Myoglobin.

(a) EThcD MS/MS Spektrum des 19-fach geladenen Precursorions von Myoglobin. (b) Der Ausschnitt des Fragmentspektrums veranschaulicht die hohe Komplexität eines *Top-down*-MS/MS-Spektrums. Es zeigt verschiedene Isotopenmuster denen ein Ladungszustand zugeordnet werden konnte. Trotz der hohen Auflösung und der großen Anzahl an akkumulierten Microscans wurden zahlreiche Isotopenmuster auch nicht erkannt.

Um die verschiedenen, sich zum Teil überlappenden Isotopenmuster unterscheiden zu können, sind eine hohe Auflösung und ein gutes Signal-zu-Rausch-Verhältnis von Nöten. Daher wurden alle MS/MS-Spektren mit einem Auflösungsvermögen von 120.000 aufgezeichnet und 10 Microscans pro Scan akkumuliert. Mindestens zehn Scans wurden für ein informatives *top-down*-MS/MS Spektrum summiert, sodass dieses geringstenfalls einhundert Microscans enthielt. Außerdem wurden die höchstmöglichen AGC-Targetwerte für Precursorionen und ETD-Reagent sowie lange Injektionszeiten verwendet, um die Spektrenqualität zusätzlich zu steigern. Diese Vorgehensweise zieht eine äußerst lange Messzeit nach sich und erfordert ein stabiles ESI-Spray, sodass eine sinnvolle *top-down*-Fragmentierung nur über Direktinjektion mit einer Nanoelektrospraykapillare gelang. Für die chromatographische Zeitskala war diese Methodik nicht schnell und empfindlich genug. Als Fragmentierungstechniken wurden ETD und EThcD miteinander verglichen. Zusätzlich wurden die Auswirkungen einer geringen *in-source* Fragmentierung in Kombination mit ETD oder EThcD untersucht. Die erfassten Rohdaten wurden im Anschluss mit Hilfe der Software ProSight Lite™ ausgewertet.²⁸³ Den geringsten Informationsgehalt boten die ETD-Fragmentspektren (vgl. Abbildung 56). Mit ihnen ließ sich ca. ein Drittel der Sequenz abdecken.

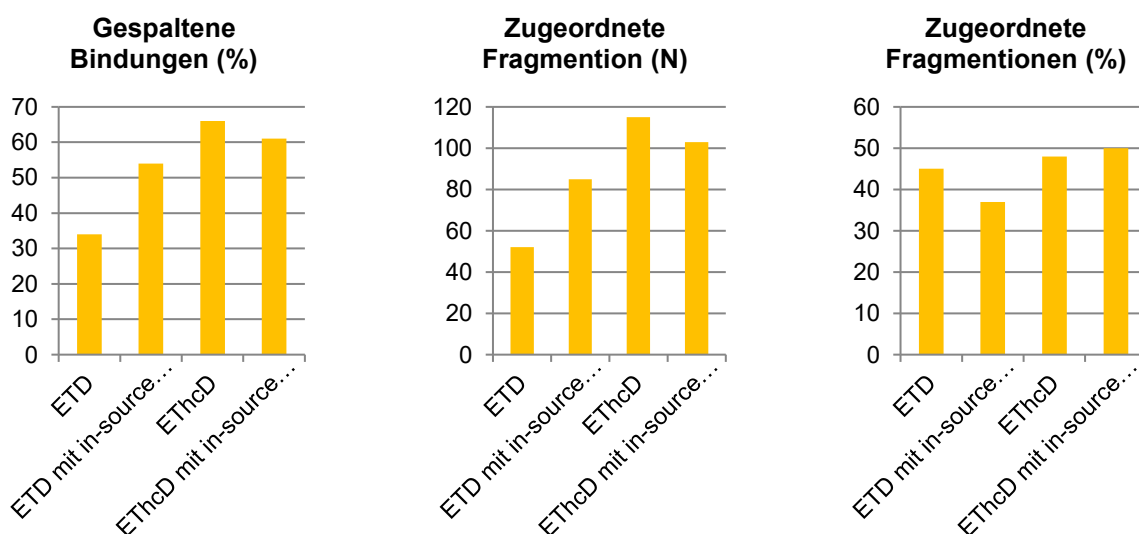


Abbildung 56: Vergleich der Leistungsfähigkeit verschiedener ETD-Techniken zur *top-down*-Fragmentierung von Myoglobin.

Jeweils mindestens 100 Microscans wurden für jede Bedingung akquiriert und die Rohdaten mittels ProSight Lite™ ausgewertet.

Die Hinzunahme der *in-source* Fragmentierung steigerte die Sequenzabdeckung auf über 50%. Mit 115 zugeordneten, Fragmenten und einer Sequenzabdeckung von 66% wurde das beste Ergebnis mit der EThcD Fragmentierung erzielt. Eine zusätzliche *in-source* Fragmentierung brachte keine nennenswerten Verbesserungen für EThcD. Interessanterweise wurden nur maximal 50% aller erkannten

Fragmente, dies umfasst die Erkennung des Isotopenmusters und die Bestimmung des Ladungszustandes durch die Software, einem Fragmention zugeordnet. Dies untermauert wiederum die hohe Komplexität der Spektren und dass ein großer Teil ihres Informationsgehaltes bislang nicht ausgeschöpft wird.

Als ideale EThcD-Fragmentierungsbedingungen stellten sich eine kurze ETD-Reaktionszeit von 6 ms und eine geringe zusätzliche HCD-Aktivierung von 15% NCE heraus. Eine weitere Erhöhung der zusätzlichen Aktivierung, wie sie beispielweise bei Peptiden Anwendung findet, war kontraproduktiv. Es ist davon auszugehen, dass unter diesen sanften EThcD-Fragmentierungsbedingungen ohne *in-source* Fragmentierung die überwiegende Mehrheit der labilen Proteinmodifikationen stabil ist. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, mit dieser Technik Informationen über Sequenzabschnitte zu erhalten, die mit einem *bottom-up*-Ansatz nicht erfasst werden. Beispielweise wurde bei der Charakterisierung der pyrophosphorylierten Myoglobinmutante der Abschnitt zwischen den Aminosäuren 97 bis 102 aufgrund sehr kurzer Peptide nicht erfasst. Der *top-down*-Ansatz hingegen deckte diesen Bereich ab (vgl. Abbildung 57).

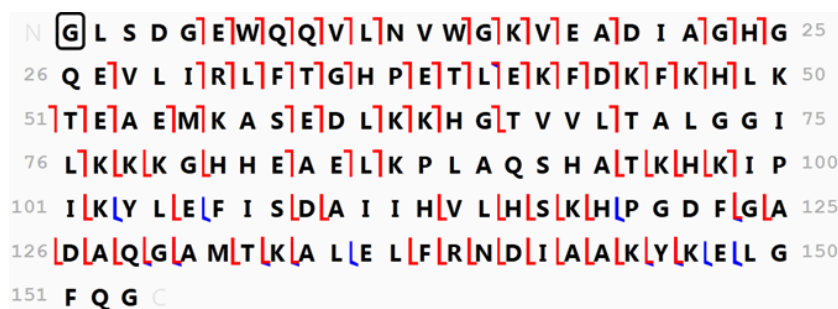


Abbildung 57: Sequenzabdeckung des Myoglobins nach *top-down*-Fragmentierung mittels EThcD.

Die Bindungsspaltungen sind durch die roten (c- und z-Ionen) und blauen (b- und y-Ionen) Haken symbolisiert.

Insbesondere bei Proteinen die im Zuge des Verdaus sehr kurze Peptide generieren (z.B. Histone), können solche *top-down* oder entsprechende *middle-down*-Ansätze eine sinnvolle Alternative darstellen. Trotz all dieser Vorteile ist dennoch zu konstatieren, dass der *top-down*-Ansatz nicht an die Empfindlichkeit eines *bottom-up*-Proteomikansatzes heranreicht und dass der *bottom-up*-Ansatz der Fragmentierung des intakten Proteins bei der Charakterisierung von synthetisch eingeführten Modifikationen vorzuziehen ist.

3.4 Grenzen der EThcD-Fragmentierung

Die vorangegangenen Kapitel waren gekennzeichnet von diversen Vorteilen der EThcD-Fragmentierung. In diesem Kapitel sollen die Limitierungen ETD-basierter Techniken diskutiert werden.

Betran *et. al* haben das ETD-Fragmentierungsverhalten von lysinphosphorylierten Peptiden mit zahlreichen weiteren unmodifizierten Lysin- und Argininresten näher untersucht und konnten zeigen, dass es zu einer Migration des Phosphatrestes zu anderen Akzeptoren (wie z.B. Serin oder Lysin) kommen kann. Damit wurde die allgemeine Auffassung, dass Peptidmodifikationen stabil sind unter ETD-Bedingungen relativiert. Diese Gasphasenumlagerungen nehmen jedoch mit steigendem Ladungszustand der Precursorionen ab.⁶⁹ Peptide, die solche Aminosäuresequenzen aufweisen, treten relativ selten in *bottom-up*-Ansätzen auf, da in der Regel Trypsin als Protease eingesetzt wird. Mehrere Lysinreste innerhalb eines Peptides nach tryptischen Verdau sind das Resultat von Fehlsplaltungen. Außerdem weisen nur sehr wenige Proteine solche polybasischen Sequenzen auf. Dazu zählen unter anderem die Histone. Um deren verschiedene Proteoformen zu studieren, werden teilweise andere Proteasen wie zum Beispiel Arg-C eingesetzt, sodass durchaus Peptide mit diversen Lysinresten entstehen können.

Vor diesem Hintergrund wurden verschiedene lysinphosphorylierte Peptide, deren Sequenzen vom Histon H1 stammen, synthetisiert und einer EThcD-Fragmentierung unterzogen. Exemplarisch dafür ist in Abbildung 58 das EThcD-Spektrum des dreifach geladenen Precursorions des Peptides ¹¹APAPAEpKpTPVKKKA²⁴ abgebildet.

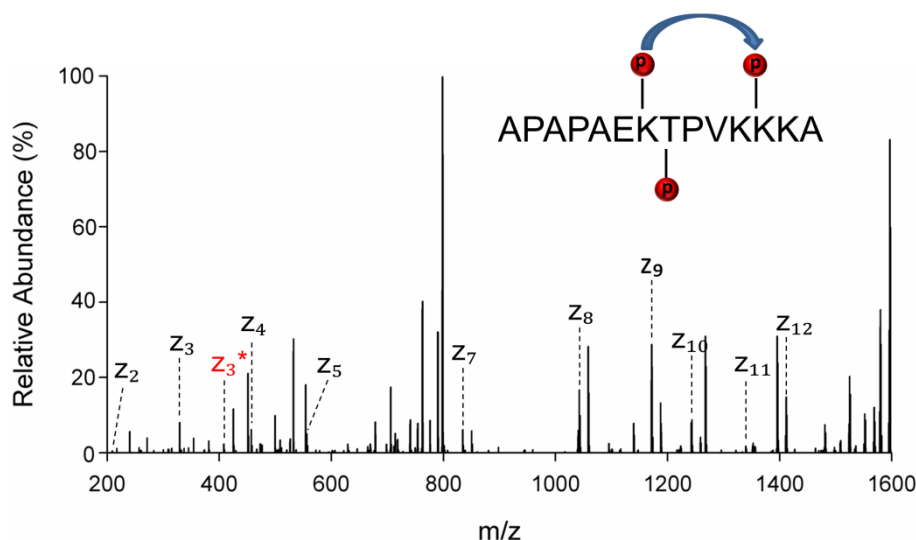


Abbildung 58: Migration von Phosphatresten lysinphosphorylierter Peptide während EThcD.

EThcD MS/MS Fragmentspektrum des dreifach geladenen Precursorions des Peptides APAPAEpKpTPVKKKA. Neben der korrekten z-Ionenserie weist das Spektrum das Fragment z_3^* , welches eine Phosphorylierung des Lysinrestes Lys-12 anzeigt, auf. Das durch Migration entstandene Fragment ist mit einem Stern hervorgehoben.

Obwohl dieses Peptid ausschließlich an den Positionen Lys-7 und Thr-8 im Peptid phosphoryliert ist, lässt sich das Fragment z_3^* finden, welches eine Phosphorylierung der Positionen Lys-12 indiziert. Dies weist zwar in Relation zu der korrekten z -Ionenserie eine geringere relative Abundanz auf, kann jedoch bei einem Peptid dessen Modifizierungsstelle unbekannt ist, die Interpretation erschweren oder gar zu Fehlinterpretationen führen.

Das gleiche Peptid tritt auch vierfach geladen auf. Das entsprechende ETHCD-Spektrum weist eine lückenlose Sequenzabdeckung auf und ermöglicht eine zweifelsfreie Lokalisierung der Phosphorylierungsstelle. Bei einem untargeted *bottom-up*-Ansatz wird jedoch nicht immer der höchste Ladungszustand eines Peptides fragmentiert. Es ist zwar theoretisch durchaus möglich bevorzugt den höchsten Ladungszustand eines Peptides für die Fragmentierung auszuwählen, in der Praxis gelingt dies jedoch meist nicht, da die relative Abundanz des Precursorions zu gering ist oder der Ladungszustand nicht korrekt im MS^1 erkannt wird. In dem diskutierten Beispiel hatte das vierfach geladene Precursorion nur ca. 1% der relativen Intensität des dreifach geladenen.

Ein weiterer Nachteil besteht in der relativ langen Zykluszeit der EThcD-Fragmentierung. Während die HCD Fragmentierung nur wenige Millisekunden in Anspruch nimmt, benötigt man allein für den ETD-Prozess eines doppelt geladenen Precursors mindestens 100 ms. Dieser Unterschied spielt bei der Charakterisierung weniger Proteine und Peptide auf einer chromatographischen Zeitskala keine Rolle, kommt jedoch bei komplexen, proteomischen Fragestellungen zum Tragen. Daher besteht ein Kernanliegen der folgenden Kapitel (z.B. Kapitel 3.5.2.6; 3.6.6 & 3.6.8) darin, Strategien zu entwickeln, die einen sinnvollen und effizienten Einsatz der EThcD-Fragmentierung ermöglichen und die beschriebenen Nachteile egalisieren.

3.5 Strategien zur Identifizierung endogener Lysinphosphorylierungen

Mit dem Ziel, die ersten endogenen Lysinphosphorylierungen zu lokalisieren, gilt es zu Beginn verschiedene proteomische Strategien zu diskutieren. Wie zuvor in Kapitel 1.1.1 erwähnt, erfolgte die erste Beschreibung einer möglichen Lysinphosphorylierung auf dem Histon H1. Daraus resultiert zwangsläufig die Frage, ob man sich gezielt auf die Identifizierung einer Lysinphosphorylierungsstelle auf diesem Protein konzentriert oder eine komplementäre Strategie verfolgt und proteomweit nach Lysinphosphorylierungen sucht. Während die Fokussierung auf das Histon H1 die logische Schlussfolgerung aus den vorangegangenen Studien darstellt, so haben vor allen Dingen verschiedene Phosphoproteomstudien in der Vergangenheit zur Identifizierung neuer labiler Phosphorylierungen geführt. Beide Strategien umfassen zusätzlich zu der inhärenten Labilität von Lysinphosphorylierungen besondere Herausforderungen für die Methodenentwicklung, welche zusammen mit möglichen Lösungsansätzen im Folgenden diskutiert werden sollen.

Für das Histone H1 sind verschiedene Varianten (H1.1, H1.2, H1.3, H1.4 & H1.5) bekannt, deren Sequenzen zu großen Teilen konserviert sind. Insbesondere in der globulären Domäne des Proteins weisen die verschiedenen Varianten frappierende Ähnlichkeiten in ihrer Aminosäureabfolge auf, aber auch die *N*- und *C*-terminalen Domänen unterscheiden sich nur marginal in ihrer Sequenz (vgl. Abbildung 59).²⁸⁴



Abbildung 59: Gegenüberstellung der verschiedenen Histon H1 Isotope.

Große Übereinstimmungen finden sich in den globulären Domänen der Proteine. Die *N*- und *C*-terminalen Regionen sind weniger konserviert.²⁸⁴

Dies hat zur Folge, dass eine exakte Zuordnung einer PTM zu einer der Varianten erheblich erschwert und oftmals unmöglich ist. Eine Lösung besteht darin, relativ lange Peptide zu erzeugen und zu analysieren, um möglichst umfangreiche Sequenzinformation zu erhalten. Solche Peptide lassen sich jedoch nicht mit einem herkömmlichen tryptischen Verdau generieren, da die Sequenz des Histon H1 aus diversen Lysinresten besteht und die Verwendung dieser Protease zu sehr kurzen, schwierig zu identifizierenden Peptiden führt. Eine sinnvolle Alternative stellt der Einsatz der Endopeptidase Arg-C dar. Wie ein *in silico* Verdau zeigt, würden die daraus resultierenden Peptide eine Länge aufweisen, welche sich mit tandemmassenspektrometrischen Verfahren erfassen lassen. Aufgrund der diversen basischen Funktionalitäten, welche diese Peptide beinhalten, ist jedoch von einem problematischen RP-chromatographischen Verhaltens auszugehen. Darüber hinaus nehmen diese Peptide nach der ESI eine breite Verteilung an verschiedenen Ladungszuständen ein. Nicht zuletzt wurden Migrationen von Lysinphosphorylierungen entlang des Peptidrückrates, welche eine zweifelsfreie Lokalisierung erschweren, bei Modellpeptiden des Histon H1 unter ETD-Bedingungen beobachtet.⁶⁹ Zur Überwindung dieser Hürden wurde in Zusammenarbeit mit Frau Hauser der Nutzen eines Derivatisierungsschritt an lysinphosphorylierten Peptiden des Histon H1 evaluiert.

Zusätzlich zu dem hohen Maß an Homologie ist ein breites Spektrum an verschiedenen PTMs, wie Acetylierungen, Ubiquitinylierungen, Formylierungen und Methylierungen für das Histon H1 dokumentiert. Diese treten in verschiedenen Kombinationen auf und können wie z.B. im Fall der Methylierung zur mehrfachen Modifikation eines Aminosäurerestes führen.^{284, 285} Diese enorme Komplexität zieht einen hohen Anspruch an die Qualität der erzeugten Daten und deren bioinformatische Auswertung nach sich.

Nicht zuletzt erfordert dieser Ansatz eine Probenvorbereitung, welche eine selektive Isolation des Histon H1 oder einer Fraktion angereichert mit Histonproteinen unter Erhalt möglicher Lysinphosphorylierungen, ermöglicht.

Bei der zweiten Herangehensweise, der proteomweiten Suche nach Lysinphosphorylierungen, muss im ersten Schritt ein Anreicherungsverfahren entwickelt oder optimiert werden, welches die Anreicherung von Phosphopeptiden unter Erhalt labiler Phosphorylierungen ermöglicht. Man beachte, dass in diesem Fall die Anreicherung auf Peptid- und nicht auf Proteinebene erfolgt. Nach dem Anreicherungs-schritt ist man mit einer enormen Anzahl an Phosphopeptiden, von denen der überwiegende Anteil Serin- und Threoninphosphorylierungen zuzuordnen ist, konfrontiert. In der Regel reicht ein einziger LC-MS-Lauf nicht aus, um die Majorität der Phosphopeptide zu erfassen, sodass ein weiterer Fraktionierungsschritt von Nöten ist. Nicht zuletzt stellt dieser Ansatz besonders hohe Ansprüche an die Schnelligkeit und Empfindlichkeit der massenspektrometrischen Methode.

3.5.1 Proteomikansatz zur Identifizierung von pLys auf dem Histon H1

3.5.1.1 Derivatisierung von Histonmodellpeptiden

Um die chromatographischen und massenspektrometrischen Eigenschaften potentiell phosphorylierter Aminosäuresequenzen des Histon H1 zu untersuchen, wurden verschiedene Peptide des Proteins sowohl als phosphorylierte als auch als unphosphorylierte Spezies synthetisiert. Exemplarisch dafür sind in Abbildung 60 das extrahierte Ionenchromatogramm und das MS¹ des unphosphorylierten Peptides ²¹KKKARKSAGAAKRKASG³⁷ dargestellt.

Es wird deutlich, dass der überwiegende Teil des Peptides beinahe keine Retention auf der RP-Trennsäule erfährt und der Peak ein extremes Tailing, welches sich über die gesamte Zeit der chromatographischen Trennung erstreckt, aufweist. Zusätzlich zu dieser ungünstigen Peakform mussten außerordentlich große Mengen des Peptides von ca. 10 pm injiziert werden, um eine Detektion zu ermöglichen.

Die sechs Lysinreste und der freie *N*-Terminus des Peptides stellen zahlreiche Positionen dar, die während des ESI-Prozesses leicht protoniert werden können. Dies hat zu Folge, dass für das Peptid Precursorionen mit Ladungszuständen von zwei bis fünf zu finden sind. Um eine mögliche Migration einer Lysinphosphorylierung auszuschließen, müsste die fünffach protonierte Spezies gewählt werden. Dies wäre jedoch das niedrig abundanteste Precursorion, sodass erhebliche Einbußen in Bezug auf die Empfindlichkeit hingenommen werden müssten. Darüber hinaus beinhaltet das entsprechende Fragmentenspektrum eines solch hochgeladenen Precursorions Fragmente mit verschiedenen Ladungszuständen und stellt somit hohe Anforderungen an die Detektion (Auflösung) und Auswertung.

Um das chromatographische Verhalten zu verbessern, ist der Einsatz einer anderen chromatographischen Trenntechnik wie z.B. HILIC denkbar.²⁸⁶ Dennoch ist auch in diesem Fall von einer ungünstigen Ladungsverteilung auszugehen. Des Weiteren sind sowohl der experimentelle als auch der apparative Aufwand zur Implementierung einer neuen LC-MS-Kopplung relativ hoch. Vor diesem Hintergrund wurde eine Derivatisierung vorgezogen.

Umfangreiche Studien zur Derivatisierung von Histonen wurden von verschiedenen Gruppen durchgeführt und die Vor- und Nachteile einzelner Reagenzien evaluiert.^{287, 288} In dieser Arbeit wurde sich auf das etablierte Protokoll von Garcia *et al.*, bei dem die Proteine oder Peptide mit Propionsäureanhydrid umgesetzt werden, konzentriert und verschiedene Peptidsequenzen mit zahlreichen Lysinresten durch Frau Hauser derivatisiert.²⁸⁹ Im unteren Teil der Abbildung 60 wird deutlich, dass diese Propionylierung der Lysinreste zu einer signifikanten Erhöhung der Hydrophobizität des Peptides führen, sodass das Peptid unter Verwendung des gleichen chromatographischen Gradientens, dessen Trennstrecke sich über 45 min hinzog, ca. 30 min später eluierte. Neben der gewünschten Retention, weist der Peak eine symmetrische Peakform mit einer schmalen Peakhalbwertsbreite (FWHM) von ca. 5 s auf. Außerdem wurde die Ladungsverteilung verkleinert und auf das dreifach protonierte Peptid fokussiert,

sodass das MS² Spektrum hauptsächlich aus einfach geladenen Fragmenten bestand und eine geringe Komplexität aufwies (siehe Anhang).

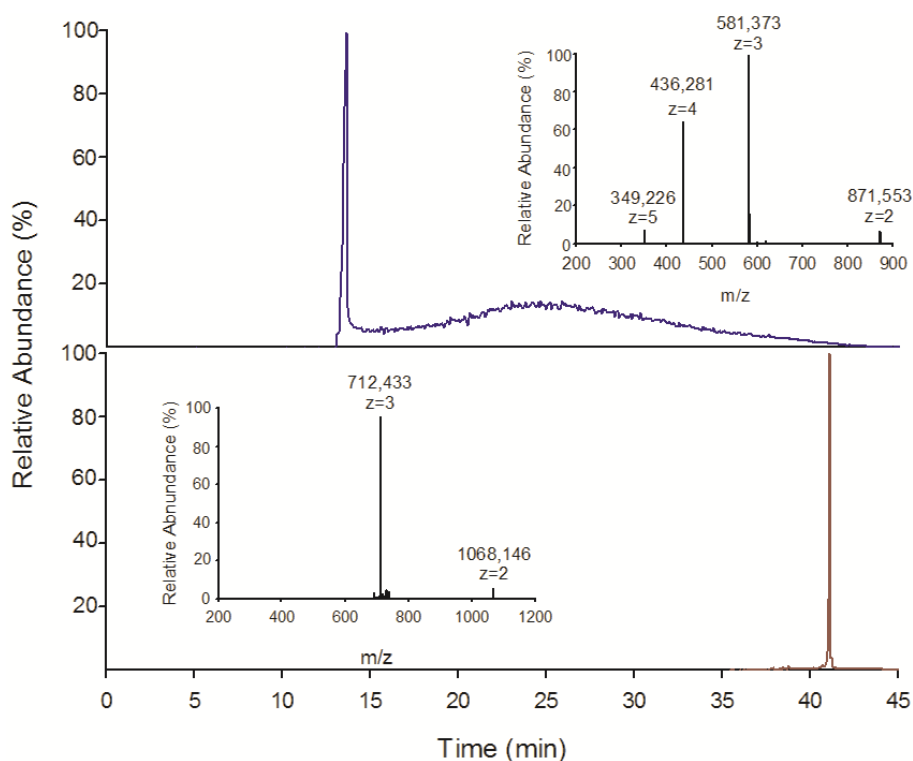


Abbildung 60: Einfluss der Propionylierung auf das RP-chromatographische Verhalten und die Ladungsverteilung des Histone H1 Peptids KKKARKSAGAAKRKASG.

Das unmodifizierte Peptid zeigt ein extremes Tailing und Ladungszustände von 2+ bis 5+ (obere Darstellung). Nach der Propionylierung erfolgt eine ausreichende Retention unter RP-Bedingungen. Der entsprechende Peak hat eine symmetrische Form und eine kleine Peakhalbwertsbreite. Die Ladung des Precursorions fokussiert sich auf den dreifachen Ladungszustand (untere Darstellung).

Auch wenn kein direkter Vergleich zwischen dem unmodifizierten Peptid und dem propionylierten Counterpart erfolgte, so kann man davon ausgehen, dass der Derivatisierungsschritt eine erhebliche Erhöhung der Empfindlichkeit zur Folge hatte.

Im nächsten Schritt wurden der Umsatz und die Selektivität der Derivatisierung untersucht. Für das untersuchte Modellpeptid sind sieben Propionylierungen möglich. In dem untersuchten Reaktionsgemisch entfielen ca. 30% auf die vollkommen, modifizierte, 63% auf die sechsfach, 6% auf die fünffach, und weniger als ein Prozent auf die vierfach propionylierte Spezies (vgl. Abbildung 61).

Setzt sich diese unvollkommene Derivatisierung auf Proteinebene fort, sind damit einige Vor- und Nachteile verbunden. Ein wichtiger Nachteil ist, dass man auf diesem Weg aus ursprünglich einer Spezies verschiedene Derivate generiert und sich somit die Komplexität des Hydrolysats erhöht, sowie sich die Abundanz für jedes dieser Derivate erniedrigt. Außerdem bedeutet dies für die datenbankge-

stützte Analyse der Histonpeptide, dass eine weitere variable Modifikation für Lysinreste und dem *N*-Terminus von Proteinen zu den bereits zahlreichen endogenen Modifikationen hinzugefügt werden muss. Dadurch erhöhen sich der bioinformatische Rechenaufwand und das Risiko falsch zugeordneter Spektren.

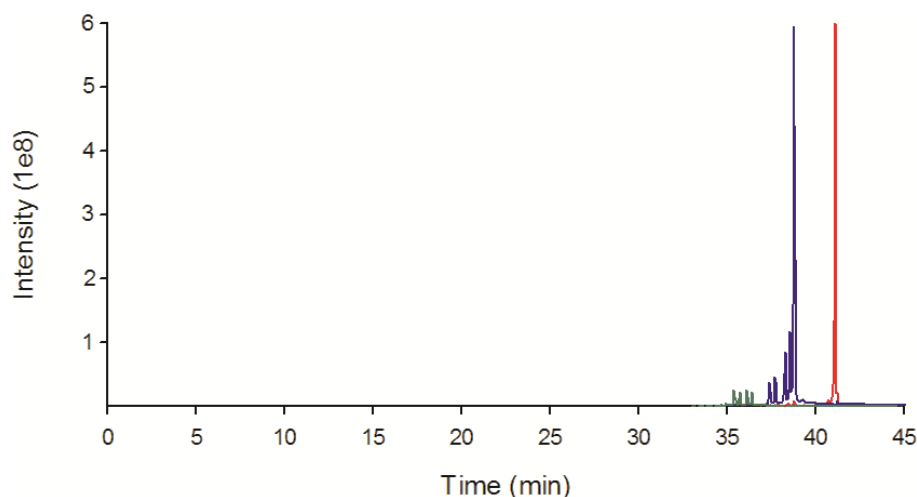


Abbildung 61: Overlay der extrahierten Ionenchromatogramme der siebenfach (rot) sechsfach (blau) und fünffach (grün) propionylierten Spezies des Modellpeptides KKKARKSAGAAKRKASG.

Auf der anderen Seite ist es somit möglich, nach dem tryptischen Verdau, verschiedene sich überlappende Peptidsequenzen und gesicherte Sequenzinformationen zu erhalten. Findet jedoch eine quantitative Derivatisierung statt, so erfolgt die Spaltung durch Trypsin ausschließlich am C-Terminus von Arginin. Dieses Verhalten wird auch als Pseudo-ArgC-Spaltung bezeichnet.

Nebenreaktionen, welche beispielsweise zu Modifikationen von Serin- oder Argininresten führten, wurden nicht beobachtet, sodass man sich bei der Auswertung auf Propionylierungen von Lysinresten und den *N*-Terminus des Proteins konzentrieren kann.

3.5.1.2 Derivatisierung von lysinphosphorylierten Histonmodellpeptiden

Nach den erfolgsversprechenden Ergebnissen bei der Propionylierung unmodifizierter Peptide wurde dazu übergegangen, das Prozedere auf lysinphosphorylierte Peptide zu übertragen. Dazu wurde die zuvor untersuchte Peptidsequenz KKKARKSAGAAKRKASG durch Frau Hauser im Labor von Prof. Hackenberger selektiv an der Position Lys-6 phosphoryliert und anschließend propionyliert. Es galt zu untersuchen, ob die Derivatisierung des lysinphosphorylierten Peptides ohne Verlust der labilen Modifikation von statten geht und inwieweit die zahlreichen zusätzlichen Modifikationen das Fragmentierungsverhalten des Peptides beeinflussen. Abbildung 62 ist zu entnehmen, dass sich die gewünschten

Eigenschaften auf die lysinphosphorylierte Spezies übertragen lassen. Das Peptid zeigt eine ausreichende Retention unter RP-chromatographischen Bedingungen und eine akzeptable Peakform. Darüber hinaus zeigt das MS¹ des sechsfach modifizierten Peptides eine schmale Ladungsverteilung, welche sich auf den dreifach geladenen Zustand fokussiert. Am wichtigsten ist jedoch, dass die Propionylierung unter Erhalt der Lysinphosphorylierung erfolgte.

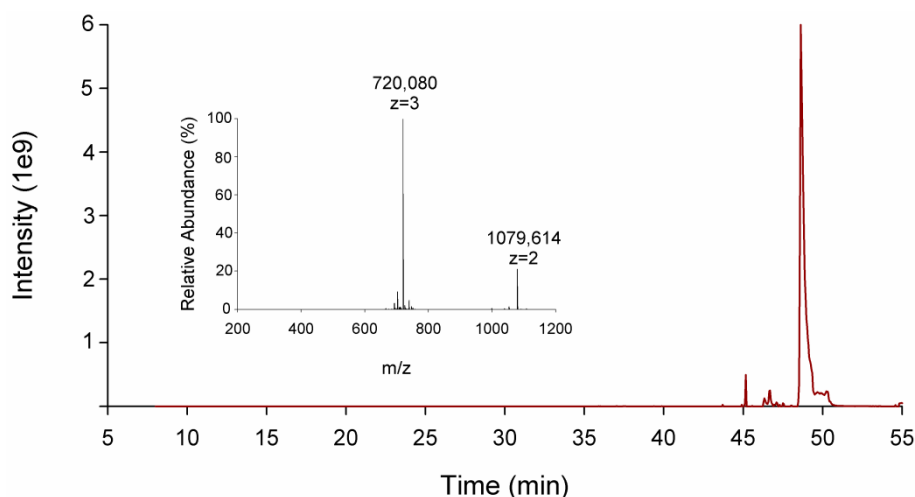


Abbildung 62: Chromatographisches und massenspektrometrisches Verhalten des propionylierten pLys-Histonpeptides 2prKprKprKARpKSAGAAprKRprKASG.

Die zahlreichen Modifizierungen stellen eine besondere Herausforderung für die Tandemmassenspektrometrie dar und das dazugehörige ETHCD-Spektrum zeigt verschiedene Neutralverlustspezies (u.a. der Propionsäure) ausgehend von Precursor- und ladungsreduziertem Precursorion. Trotzdem finden sich immer noch ausreichend Fragmente, welche aus der Spaltung des Peptidrückrates stammen und die labile Modifikation tragen, sodass eine zweifelsfreie Lokalisierung von pLys möglich war. Fragmentationen, welche Gasphasenumlagerungen zu den benachbarten Arginin- und Serinresten anzeigen würden, wurden nicht detektiert. Des Weiteren konnte ein Transfer zu benachbarten Lysinresten ausgeschlossen werden, da diese durch den Propionylrest besetzt waren (siehe Anhang). Diese Beobachtung ist von wesentlicher Bedeutung, da somit durch die Derivatisierung nicht nur die chromatographischen Eigenschaften lysinphosphorylierter Histonpeptide verbessert wurden, sondern eine Lösung für die Problematik der Phosphatmigration während der ETD (vgl. Kapitel 0) gefunden wurde.

3.5.1.3 Derivatisierung von Histon H1

Das erfolgreich auf Peptidebene angewandte Propionylierungsprotokoll wurde im nächsten Schritt auf Proteinebene unter Verwendung eines Histon H1-Standards erprobt. Da bislang keine Syntheseroute bekannt ist, welche eine positionsspezifische Phosphorylierung auf Proteinebene ermöglicht, wurde sich bei der Derivatisierung durch Frau Hauser auf das unmodifizierte Protein beschränkt. Das Proto-

koll sah vor, dass nach der Propionylierung ein möglichst kurzer Pseudo-ArgC-Verdau mit Trypsin erfolgen und dieses Peptidgemisch mittels nanoLC-MS/MS analysiert werden sollte. In Abhängigkeit von den Bedingungen für den tryptischen Verdau (Temperatur und Zeit) wurden auf diesem Weg Sequenzabdeckungen von 37 bis 43% erreicht (vgl. Abbildung 63).

MSETAPAAPAAPAPAEKTPVKKKARKSAGAAARKASGPPVSELITKAVAASKERSGVSLAALK-
KALAAAGYDVEKNNSRIKLGKSLVSKGTLVQTKGTGASGSFKLNKKAASGEAKPKAKKAGAA-
KAKKPAGAAKKPKKATGAATPKKSAKKTTPKKAKKPAAAAAGAKKAKSPKKAK-
AAKPKKAPKSPAKAKAVKPKAAKPKTAKPKAAKPKKAAAKKK

Abbildung 63: Sequenzabdeckung einer Histon H1 Variante nach Propionylierung und anschließendem Pseudo-ArgC-Verdau mit Trypsin.

Der identifizierte Sequenzabschnitt ist grün hinterlegt. Aminosäurereste, welche mit einer Propionylierung detektiert wurden, sind blau und Argininreste an den gespalten wurde grau hervorgehoben.

Für die Charakterisierung des gesamten Histon H1 war dies ein unbefriedigendes Ergebnis, da nur ca. ein Drittel des Proteins charakterisiert wurde. Möchte man sich jedoch auf den *in vivo* stark modifizierten und lysinreichen *N*-Terminus des Proteins konzentrieren, so ist dies die Methode der Wahl. Nach der Hydrolyse erhält man nur drei Peptide, welche sich einfach mit Hilfe eines datenabhängigen EThcD-Ansatzes und anschließender Datenbanksuche identifizieren lassen (siehe Anhang), sowie den *N*-Terminus lückenlos abdecken. Selbst bei einem Gemisch aus verschiedenen Histonen und deren zahlreichen Proteoformen besteht somit die Möglichkeit den *N*-Terminus der Histone auf Lysinphosphorylierungen hin zu untersuchen. Basis dessen ist eine selektive Anreicherung der Histone. Unter diesem Gesichtspunkt wurde eine Chromatographie zur Trennung von Proteinen entwickelt.

3.5.1.4 WCX-Chromatographie zur Trennung von Proteinen

Ein wichtiger Schritt bei der Entwicklung einer analytischen Methode zur Charakterisierung von pLys auf dem Histon H1 stellt die Anreicherung und Abtrennung der Histone von anderen Proteinen dar. Aufgrund der zahlreichen Lysinreste weist das unmodifizierte Histon H1 einen ungewöhnlich hohen piezoelektrischen Punkt (Pis) von ca. 11 auf und kann über 50 positive Ladungen tragen.²⁹⁰ In Abhängigkeit von der Anzahl und Art der PTMs, die sich auf dem Histon befinden, schwanken diese Werte. Dennoch ist dies eine Eigenschaft, in der sich das Histon H1 von einer Vielzahl anderer Proteine abhebt. Ein einfaches und robustes Verfahren mit dem sich Proteine mit unterschiedlichen Pis trennen lassen, ist die Ionenaustauschchromatographie. Für die Trennung von Peptiden nutzt man in der Regel die starke, während für Proteine die schwache Kationenaustauschchromatographie (WCX) in Frage kommt. Als mobile Phase kommen dabei schwach saure oder pH neutrale Puffer zum Einsatz, sodass

die Hydrolyse der Lysinphosphorylierungen minimiert wird. Bereits während der ersten Studien zur Lysinphosphorylierung auf dem Histon H1 wurde auf diese Methode zurückgegriffen.²⁹¹

Im Zuge dieser Studie wurde eine schwache Kationenaustauschersäule, welche die Trennung von Proteinvarianten ermöglicht und zum Beispiel bei der Separation von Antikörpern eingesetzt wird, verwendet. Sie eignet sich jedoch durchaus auch für die Trennung kleinerer Proteine. Der gewählten Säulendimensionen stellen einen sinnvollen Kompromiss aus der benötigten Trennleistung und einer adäquaten Kapazität zur Isolationen ausreichend großer Mengen an Histonproteinen. Als mobile Phase kam ein Gemisch aus 2-(*N*-Morpholino)ethansulfonsäure (MES) und NaCl bei einem pH-Wert von 6,5 zum Einsatz. Dieses etablierte Puffersystem gewährleistet bei einem stabilen pH-Wert eine gute Trennung der Proteine und senkt das Risiko einer vorzeitigen Hydrolyse der Lysinphosphorylierung. Für die Optimierung des Gradientens wurde ein Gemisch aus fünf Proteinen (Myoglobin ($M \approx 17,0$ kDa, $pI = 7,1$), bovines Serumalbumin ($M \approx 66,5$ kDa, $pI = 4,7$), Cytochrom C ($M = 12,3$ kDa, $pI = 10,2$), β -Casein ($M \approx 25,1$ kDa, $pI = 4,5$) und (β -Lactoglobulin ($M \approx 19,9$ kDa, $pI = 5,1$)), welche sich in ihrem isoelektrischen Punkt und ihrer molaren Masse unterschieden, ausgewählt. Das Gradientenprofil sollte eine Abtrennung der Proteine mit niedrigem pI und das Sammeln einer Fraktion reich an Histonproteinen ermöglichen. Abbildung 64 ist zu entnehmen, dass bei dem entwickelten Gradienten Myoglobin, Serumalbumin, β -Casein, β -Lactoglobulin eine geringe Retention erfahren und nach 7 min das chromatographische System verlassen haben. Im Gegensatz dazu wechselwirkt Cytochrom C stärker mit der stationären Phase und weist eine Retentionszeit von 33,5 min auf. Dieses Beispiel zeigt, dass sich Proteine mit einem isoelektrischen Punkt >10 abtrennen lassen und das Sammeln einer Histonfraktion realistisch ist.

Trotz der vielversprechenden Ergebnisse, die mit dem Modellproteingemisch erzielt wurden, gelang es bis zuletzt nicht, dies auf die Trennung einer Histon H1 enthaltenden Probe zu übertragen. Sowohl bei der Trennung der Standardsubstanz als auch bei dem Zusatz der Standardsubstanz zu dem o.g. Gemisch konnte keine Fraktion gesammelt werden, welche das Histon H1 enthielt. Der Grund für die unbefriedigende Wiederfindung könnte in der starken Wechselwirkung des Proteins mit der stationären begründet liegen, sodass die Salzkonzentration der Komponente B von ursprünglich 200 mM auf 500 mM zu erhöhen ist.

Eine mögliche Alternative zur WCX könnte die Verwendung eines Pull-down-Experiments zur Isolation des Histon H1 darstellen.

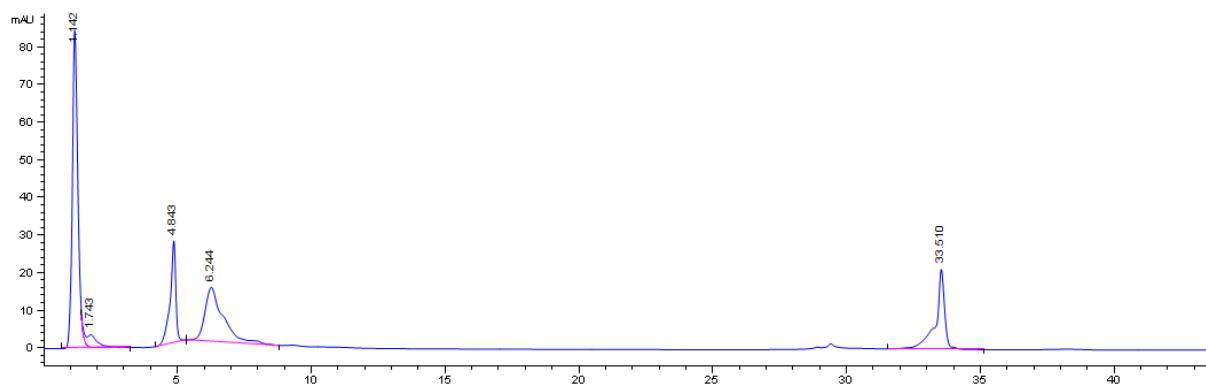


Abbildung 64: Chromatogramm der WCX-Trennung von Myoglobin, Serumalbumin, β -Casein, β -Lactoglobulin & Cytochrom C.

Deutlich zu erkennen ist die Abtrennung von Cytochrom C ($R_t = 33,5$ min).

3.5.2 Proteomweite Identifizierung labiler Phosphorylierungen

Parallel zu der Entwicklung des auf Histon H1 fokussierten Workflows zur Identifizierung der ersten endogenen Lysinphosphorylierungen, wurde ein unspezifischer *bottom-up*-Ansatz, welcher auf die proteomweite Suche nach pLys und labilen Phosphorylierungen abzielte, vorangetrieben. Da für die Anreicherung von pLys bislang noch kein selektiver Antikörper entwickelt werden konnte, wurde auf unspezifische Anreicherungsverfahren wie IMAC oder MOAC zurückgegriffen. Das daraus resultierende Phosphoproteom einer HeLa-Zellkultur enthält mehrere zehntausend Phosphopeptide. Diese lassen sich nicht innerhalb eines einzelnen HPLC-MS-Laufes (single shot) erfassen, sodass eine adäquate zusätzliche Fraktionierungstechnik gefunden werden musste. Dieses Verfahren sollte an erster Stelle die Fraktionierung des Phosphoproteoms unter Erhalt labiler Modifikationen ermöglichen.

3.5.2.1 Basische RP-Chromatographie zur Fraktionierung komplexer Peptidgemische

Die höchste Orthogonalität in einem 2D-RPLC-RPLC-MS-Ansatz wird durch eine große pH-Wertdifferenz erzielt. Da bei der HPLC-MS meist pH-Werte ≤ 3 eingesetzt werden, muss demzufolge die Fraktionierung bei einem hohen pH-Wert (9-10) erfolgen. Für die Fraktionierung labilphosphorylierter Peptide wurde sich für einen pH-Wert von 8 entschieden. Dieser stellt einen sinnvollen Kompromiss aus einer ausreichenden Orthogonalität und Bedingungen, welche die Hydrolyse labiler Phosphorylierungen minimieren, dar. Für die mobile Phase wurde 10 mM NH_4HCO_3 -Lösung gewählt. Die geringe Salzkonzentration reicht aus um den pH-Wert einzustellen und lässt sich gleichzeitig nach der Fraktionierung leicht, während dem Einengen in der Vakuumzentrifuge oder über die Ladesäule des na-

noLC-MS-Systems, entfernen. Als stationäre Phase kam eine XBridge Peptide BEH C₁₈ Säule zum Einsatz. Diese besitzt Partikel, die gekennzeichnet sind durch eine hohe Kohlenstoffbeladung und deren Porengröße optimiert ist für die Trennung von Peptiden. Die stationäre Phase ist stabil über einen weiten pH-Wertbereich und lässt sich über einen langen Zeitraum unter basischen Bedingungen betreiben. Die gewählten Säulendimensionen gewährleisteten eine ausreichende Kapazität, ohne große Kompromisse bei den Trenneigenschaften eingehen zu müssen.

Für die Entwicklung des Gradientenprofils und zur Beurteilung der Trennleistung des Systems wurde zu Beginn auf eine Probe geringer Komplexität mit einem tryptischen Verdau des Rinderserumalbumins (BSA) zurückgegriffen. Dabei galt es zu berücksichtigen, dass unter basischen Bedingungen für eine Vielzahl an Aminosäuresequenzen eine geringere Retention als bei einem niedrigen pH-Wert zu erwarten war. Beispielsweise liegen Peptide, die saure Aminosäuren enthalten, aufgrund der niedrigen pK_s-Werte für Asparaginsäure (3,90) und Glutaminsäure (4,25) als deprotoniert und negativ geladen vor und weisen somit eine geringere Hydrophobizität als in ihrer protonierten Form auf. Dem Rechnung tragend wurde ein sehr flacher Gradient, bei dem sich die organische Komponente nur gering erhöht, entwickelt (vgl. Kapitel 5.5.1). Unter diesen Bedingungen wurden für das Peptidgemisch akzeptable Peakbreiten von ca. 1 min erzielt. Die Peaks hatten in der Regel eine symmetrische Form und wiesen nur vereinzelt ein leichtes Fronting oder Tailing auf (siehe Anhang). Um die Robustheit und Reproduzierbarkeit der Trennung zu untersuchen, wurde das Gemisch an verschiedenen Tagen nach Nutzung der Säule gemessen. Es zeigte sich, dass zum Teil erhebliche Verschiebungen der Retentionszeiten von bis zu 10 min auftraten. Eine klare Tendenz, dass beispielsweise das Retentionsvermögen der Säule im Laufe der Zeit nachlassen würde, konnte jedoch nicht verzeichnet werden. Die Lagerung der Säule erfolgte bei einem Gemisch aus 50% Acetonitril und 50% Wasser. Wurde diese längere Zeit nicht genutzt, war das Retentionsvermögen unzureichend, sodass vor jeder Fraktionierung die Säule durch Messungen des Standardgemisches konditioniert wurde.

In der qualitativen und quantitativen Analytik würde eine Trennung mit solch schwankenden Retentionszeiten keine Anwendung finden. Für die Fraktionierung spielte dieses Verhalten jedoch eine untergeordnete Rolle. Von Relevanz war, dass überhaupt eine Trennung erfolgte, die Peakbreiten gering waren und eine Minute nicht überschritten (siehe Anhang).

Nach der Optimierung der chromatographischen Parameter wurde auf ein komplexeres System, einem standardisierten HeLa-Proteinverdau, übergegangen und das Potential der Fraktionierungsmethode in einem Vergleich mit einer etablierten, sauren ersten Dimension untersucht.

3.5.2.2 Vergleich von saurer und basischer RPLC als erster Dimension

Aufgrund ihrer Robustheit und guten Trenneigenschaften war eine saure Fraktionierung etabliert worden. Diese nutzte in der mobilen Phase 0,1% Ameisensäure und war somit nur bedingt für die Analyse

säurelabiler Phosphorylierungen geeignet. Als stationäre Phase kam eine Acclaim PepMap100 C18-Säule zum Einsatz. Für den Methodenvergleich wurden jeweils 10 µg eines HeLa-Standards mit beiden Techniken getrennt und 60 Fraktionen gesammelt. Um die Messzeit in der zweiten Dimension (zwei Stunden je HPLC-MS-Lauf) zu reduzieren, wurden die Fraktionen nach der in Kapitel 1.2.4 beschriebenen Strategie in sechs Zyklen gepoolt, sodass jeweils zehn Fraktionen pro Fraktionierungstechnik zu analysieren waren.

Ziel war es mit der schwach basischen Fraktionierung eine vergleichbar hohe Anzahl an identifizierten Peptiden und Proteinen wie bei der etablierten Methodik zu erhalten. Die erhaltenen Ergebnisse übertrafen die gesteckten Ziele, sodass bei gleicher Fraktionierungsmethodik und Gradientenlänge ein Zuwachs von ca. 30% an identifizierten Peptiden und ca. 20% an identifizierten Proteinen erzielt werden konnte (vgl. Abbildung 65).

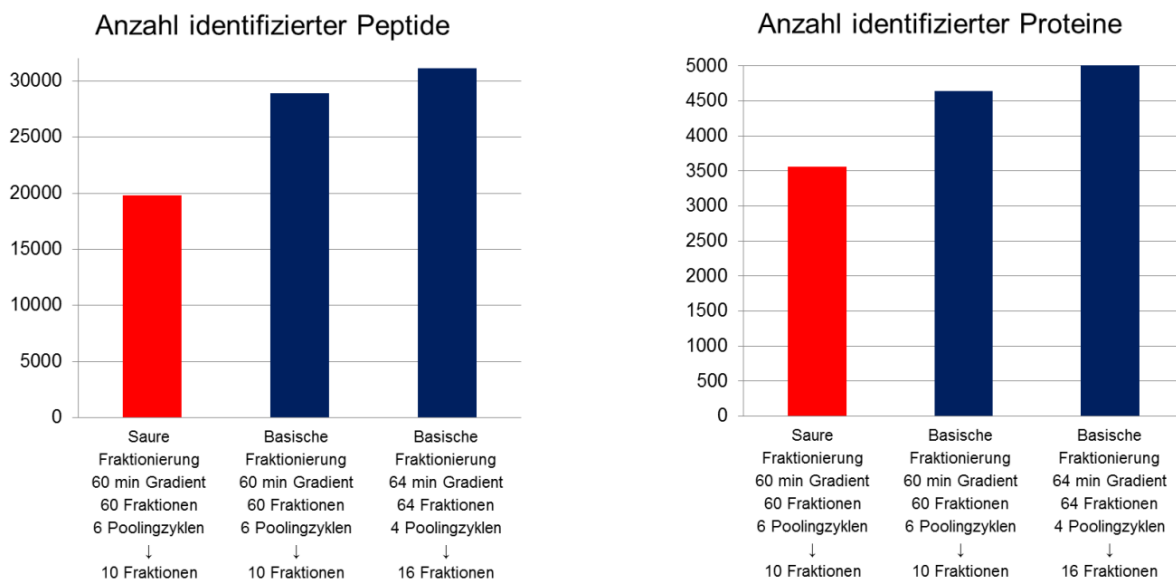


Abbildung 65: Gegenüberstellung von saurer und basischer erster Dimension in einem 2D-RPLC-RPLC-MS/MS-Ansatz zur Charakterisierung eines HeLa-Vollproteoms.

Bei gleicher Gradientenlänge und Poolingstrategie lässt sich für die optimierte basische Fraktionierung ein signifikanter Zuwachs an identifizierten Peptiden und Proteinen feststellen. Eine Erhöhung der Anzahl an gesammelten Fraktionen führt zu einer weiteren Steigerung an nachgewiesenen Peptiden und Proteinen.

Im nächsten Schritt wurde untersucht, inwieweit eine Reduktion der Poolingzyklen und demzufolge eine Erhöhung der Anzahl an gesammelten Fraktionen das Ergebnis beeinflusste. Dazu wurde das gleiche Gradientenprofil verwendet, jedoch der Fraktionierungszeitraum auf 64 min verlängert und die 64 gesammelten Fraktionen in vier Zyklen auf 16 Fraktionen reduziert. Erwartungsgemäß wurde durch die größere Anzahl an Fraktionen die analytische Tiefe noch einmal erhöht, sodass ca. 32.000 anstatt 28.000 Peptide und ca. 5.000 im Gegensatz zu 4.600 Proteine identifiziert werden konnten (vgl. Abbildung 65). Dabei gilt es jedoch zu bedenken, dass sich die Messzeit der zweiten Dimension von

ca. 20 h auf 32 h erhöhte. Im Zuge dieser Studie wurde die Orbitrap Elite™ für die LC-MS eingesetzt. Für die Evaluierung der Fraktionierungseigenschaften war dieses Gerät ausreichend. Um Phosphoproteom nach labilen Modifizierungen zu untersuchen, wurde jedoch auf die Orbitrap Fusion™ zurückgegriffen. Dieses Gerät ist erheblich empfindlicher und schneller als die Orbitrap Elite™ und ermöglicht somit die Identifizierung einer größeren Anzahl an Peptiden im gleichen Zeitraum. Mit dieser Anlage ist es beispielweise möglich in 1 µg des gleichen HeLa-Standards innerhalb einer Messzeit von drei Stunden bis zu 52.000 Peptide von über 5.000 Proteinen nachzuweisen. Unter Berücksichtigung dessen wurde sich in allen weiteren phosphoproteomischen Studien auf das Sammeln von zehn Fraktionen in sechs Zyklen während der basischen RPLC beschränkt. Dieses Prozedere ist ideal auf die chromatographischen Eigenschaften der ersten Dimension abgestimmt, robust gegenüber kleineren Veränderungen aufgrund veränderter Säuleneigenschaften sowie unterschiedlicher Proben und begrenzt die Messzeit der zweiten Dimension inklusiver aller Spülläufe auf maximal 24 h.

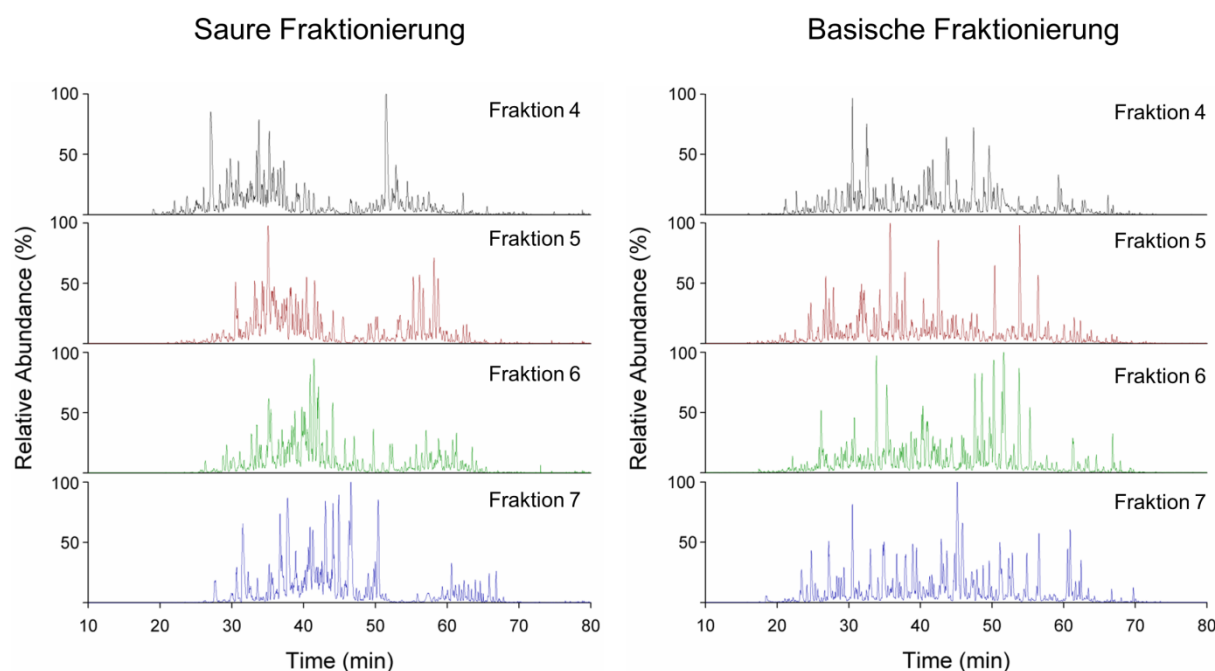


Abbildung 66: Vergleich des Fraktionierungsverhaltens nach saurer und basischer Fraktionierung.

Gegenübergestellt sind die TICs der Fraktionen vier bis sieben nach saurer und basischer Fraktionierung. Die basische Fraktionierung ermöglicht eine bessere Ausnutzung der Trennstrecke in der zweiten Dimension als die saure Fraktionierung.

Gilt es noch kurz auf die unterschiedlichen Ergebnisse zwischen saurer und basischer Fraktionierung einzugehen. Für die Fraktionierung wurden zwei weit verbreitete Säulentypen, die für die Trennung von Peptidgemischen entwickelt wurden, in ähnlichen Dimensionen verwendet. Selbst unter Berücksichtigung, dass die in der sauren Fraktionierung eingesetzte Säule möglicherweise aufgrund von Alterungsprozessen etwas an Ihrer Leistungsfähigkeit eingebüßt hatte, so war nicht der erhebliche Unterschied in den Ergebnissen beider Ansätzen zu erklären. Der Grund ist in der bereits mehrfach disku-

tierten Orthogonalität zwischen beiden Dimensionen aufgrund der verschiedenen pH-Werte zu sehen. In Kombination mit einer exakt abgestimmten Poolingstrategie ermöglicht sie eine ideale Verteilung des zu trennenden Peptidgemisches in der zweiten chromatographischen Dimension und gewährleistet somit eine optimale Auslastung der HPLC-MS (vgl. Abbildung 66).

3.5.2.3 Vergleich von HCD und EThcD bei der Analyse von Phosphoproteomen

Nach der effizienten Fraktionierung galt es als nächstes, adäquate massenspektrometrische Bedingungen für die proteomweite Suche nach pLys zu finden. Als tandemmassenspektrometrische Techniken wurde die äußerst schnelle und empfindliche HCD der sich durch gute Sequenzabdeckungen auszeichnende EThcD-Fragmentierung gegenübergestellt. Für den Vergleich wurde ein Single-shot einer TiO₂-Anreicherung von Phosphopeptiden aus HeLa-Zellen und ein langer Gradient von 3 h gewählt. Die Rohdaten wurden mit Sequest und der Suchmaschine MS Amanda ausgewertet (vgl. Abbildung 67).⁸⁷

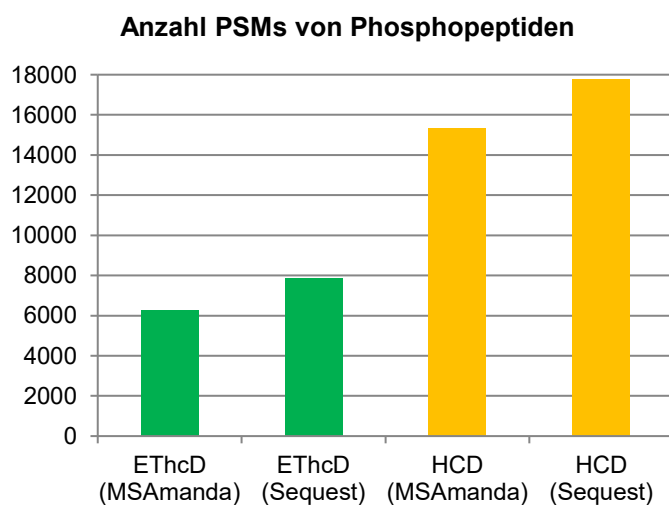


Abbildung 67: Mit HCD und EThcD erzielte Anzahl an zugeordneten PSMs von Phosphopeptiden eines HeLa-Phosphoproteoms.

Die Ergebnisse zeigten, dass bei einer höheren Komplexität der Probe die längere Zykluszeit der EThcD-Fragmentierung einen erheblichen Einfluss auf die Anzahl an zugeordneten Spektren (PSMs) hat. Unabhängig von der verwendeten Suchmaschine wurden weniger als die Hälfte an PSMs im Vergleich zu HCD erzielt. Selbst unter der Annahme, dass die Richtigkeit der zugeordneten PSMs erheblich höher als bei HCD ist, so muss konstatiert werden, dass eine Vielzahl an Phosphopeptiden nicht erfasst wurde. Insbesondere wenn man berücksichtigt, dass auch mit der HCD Fragmentierung nur ca. 50% der aufgezeichneten Spektren zugeordnet werden, so bleibt ein Großteil der Probe nicht charakterisiert.

3.5.2.4 Charakteristika bei der massenspektrometrischen Analyse von pLys-Peptiden

Da in einer datenabhängigen Aufzeichnung vorrangig die hochabundanten Signale fragmentiert werden, war davon auszugehen, dass lysinphosphorylierte Peptide mit einer ausschließlich auf EThcD-basierenden Methode möglicherweise nicht erfasst werden. Um diese Limitierung zu umgehen, bestand die Möglichkeit, das komplette Phosphoproteom schnell und empfindlich mit HCD zu charakterisieren und gezielt in einer zweiten Messung potentiell lysinphosphorylierte Peptide mit EThcD zu untersuchen. Dieses Vorgehen birgt jedoch zahlreiche Risiken. Aufgrund ihrer Labilität unter HCD-Bedingungen werden Lysinphosphorylierungen während der Datenbanksuche oftmals anderen Phosphorylierungsstellen zugeordnet und somit nicht erkannt. Auf der anderen Seite tendieren die Suchalgorithmen dazu, schwer zu lokalisierende Phosphorylierungsstellen dem am C-Terminus befindlichen Lysin zuzuordnen. Dies führt zu einer hohen Anzahl falschpositiver Ergebnisse und zu einer großen Anzahl überflüssiger zu untersuchender Precursorionen in der zweiten Messung. Wird nicht der immense Aufwand betrieben und für jedes Peptid ein Retentionszeitintervall festgelegt, so kann es aufgrund des zugelassenen Massenfehlers im MS von 10 ppm zur Fragmentierung irrelevanter Precursorionen kommen. Des Weiteren beansprucht dieser Ansatz die doppelte Messzeit, die doppelte Probenmenge und einen größeren Aufwand bei der Auswertung der Ergebnisse. Ein alternativer Ansatz sieht den gezielten Einsatz der EThcD-Fragmentierung in Kombination mit einer CID-basierten Technik vor. Dazu wurden von Frau Hauser synthetisierte pLys-Peptide mittels CID und HCD fragmentiert und die MS/MS-Spektren nach pLys-spezifischen Markerionen untersucht.

Die inhärente Labilität der Lysinphosphorylierung hatte zur Folge, dass die CID und HCD Fragmentspektren von einem Muster aus Neutralverlusten von 80, 98 und 116 Da dominiert wurden (vgl. Abbildung 68).

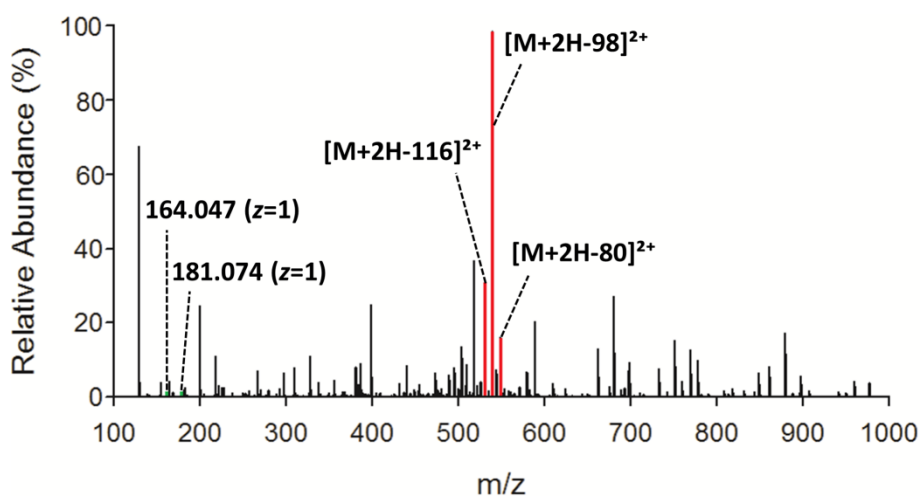


Abbildung 68: Neutralverlustmuster von pLys-Peptiden unter HCD-Bedingungen.

Das MS/MS-Spektrum des doppelt protonierten Peptides pLys10 (AKKAPpKSPAKA) zeigt Neutralverluste von 80, 98 & 116 Da.

In einer Phosphoproteomstudie konnte jedoch gezeigt werden, dass diese Muster auch bei weiteren Aminosäureresten wie zum Beispiel pSer auftritt und daher in seiner Selektivität nicht ausreicht. Aufgrund dessen wurden die Spektren nach weiteren diagnostischen Fragmentationen untersucht.

3.5.2.5 Lysinphosphoimmoniumion während der HCD Fragmentierung

Neben verschiedenen Neutralverlustmustern wurden in der Vergangenheit sogenannte Phosphoimmoniumionen, interne Fragmentationen, welche aus der zweifachen Spaltung des Peptidrückrates resultieren, für die Identifizierung von Phosphorylierungen (wie z.B. der labilen Histidinphosphorylierung) herangezogen.^{26, 130, 136, 179} Unter diesem Aspekt wurden die HCD-Spektren der labil phosphorylierten Peptide genauer untersucht. In der Tat wurden zwei charakteristische lysinphosphorylierte Immoniumionen mit m/z 164,047 und m/z 181,074 bei den untersuchten pLys-Peptiden detektiert. Exemplarisch dafür ist in Abbildung 69 das HCD MS/MS-Spektrum des Peptides pLys4 dargestellt.

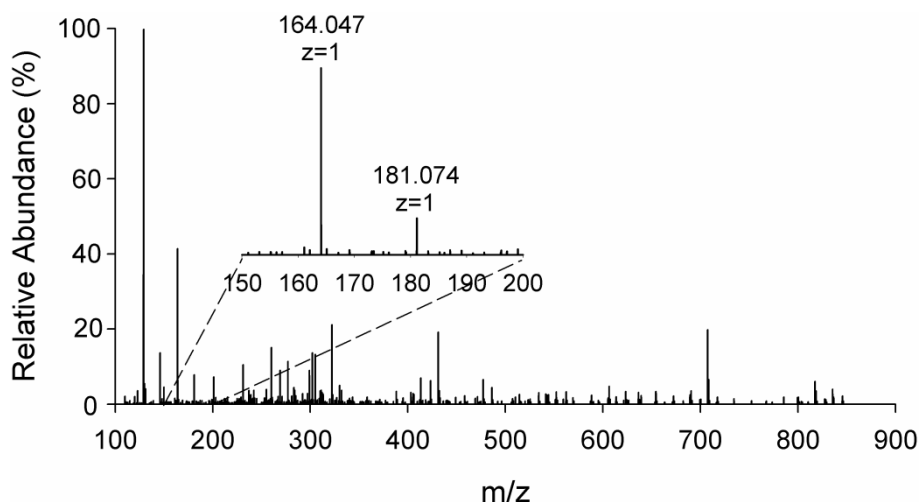


Abbildung 69: HCD-Spektrum des Peptides pLys4 (LpKTEAEMK).

Das Spektrum weist zwei charakteristische Phosphoimmoniumionen (m/z 164,047 & m/z 181,074) auf.

Das hervorgehobene Fragment m/z 181,074 entspricht exakt dem Immoniumion des Aminosäurerestes des Lysins und einem zusätzlichen Rest mit der Summenformel HPO_3 . Das Fragmention m/z 164,047 resultiert aus der zusätzlichen Abspaltung eines Ammoniakmoleküls. Die relativen Abundanzen dieser Fragmente waren bei den untersuchten Peptiden in der Regel $<10\%$, konnten jedoch auch wie in dem gezeigten Beispiel bis zu 38% erreichen (vgl. Tabelle 3).

Anhand der Peptide pLys1 bis pLys5 ließ sich feststellen, dass die relative Häufigkeit der Fragmente tendenziell zunahm je näher die Phosphorylierungsstelle am *N*-Terminus des Peptides lokalisiert war. Um daraus eine allgemeingültige Gesetzmäßigkeit abzuleiten, müsste jedoch eine größere Anzahl an Peptiden betrachtet werden. Ein ähnlicher Trend wurde zumindest für Phosphohistidin in einer prote-

Ergebnisse und Diskussion

omweiten Analyse mit über 200 Histidinphosphorylierungen festgestellt.²⁶ Die NCE hatte nur einen unwesentlichen Einfluss auf die Intensität der Phosphoimmoniumionen. Auch eine Gesetzmäßigkeit darüber, welches der beiden Ionen bevorzugt auftritt und ob dies von der CE, der Peptidsequenz oder der Position der Lysinphosphorylierung innerhalb des Peptides abhängt, konnte auf Basis des untersuchten Sets an Peptiden nicht abgeleitet werden.

Tabelle 3: Relative Abundanz von pLys-Immoniumionen während der HCD-Fragmentierung.

Peptid	Peptidsequenz	Ladungszustand z	Rel. Abund.(%)	Rel. Abund. (%)
			m/z 164,048	m/z 181,074
pLys1	AVEIDpKDSLK	2	6	1
pLys2	TAVEIDpKDSLK	2	4	<1
pLys3	TTAVEIDpKDSLK	2	3	<1
pLys4	LpKTEAEMK	2	38	8
pLys5	HLpKTEAEMK	2	<1	-
pLys6	ALELFRpKDAAK	2	<1	-
pLys7	YApKKAKS	3	-	12
pLys8	RAKASKpKSTDHPKYSDC	3	-	-
		4	2	1
		2	-	-
pLys9	RLYKLpKASKLAR	3	1	-
		4	23	6
		2	-	-
pLys10	AKKAPpKSPAKA	2	1	1
		3	22	2
pLys11	KKKARpKSAGAAKRKASG	3	3	4
pLys12	KKKARpKpSAGAAKRKASG	3	-	3
		4	-	8
pLys13	SASQSSLDpKLDQELKEQQK	3	2	0
		4	9	0
pLys14	IpKEAVK	2	38	2

Einen erheblichen Einfluss auf die relative Abundanz der pLys-Immoniumionen hatte hingegen der Ladungszustand des untersuchten Peptides. Erhöhte sich dieser, so nahm die Intensität dieser diagnostischen Fragmentionen signifikant zu. Dies sei am Beispiel des Peptides pLys9 illustriert (vgl. Abbildung 70 und Tabelle 3). Nach der ESI liegt dieses Peptid sowohl doppelt als auch als drei- und vierfach geladen vor. Während für das doppelt geladene Precursorion keine Phosphoimmoniumionen detektiert werden konnten, wurde für die dreifach geladene Spezies das Phosphoimmonium m/z 164,048 mit einer relativen Abundanz von ca. 1% nachgewiesen. Das MS/MS-Spektrum des vierfach geladenen Precursors zeigte beide Phosphoimmoniumionen mit höheren, relativen Abundanzen.

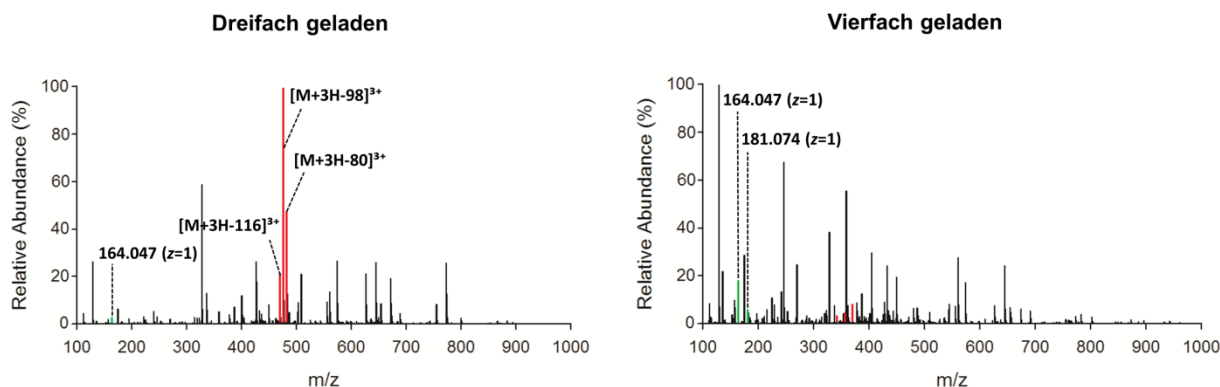


Abbildung 70: Einfluss des Ladungszustandes auf die Abundanz von pLys-Immoniumionen.

Gegenübergestellt sind die HCD-Spektren des dreifach und des vierfach geladenen Precursorions des Peptides **pLys9** (RLYKLpKASKLAR). Zu erkennen ist ein signifikanter Anstieg bei einer Erhöhung des Ladungszustandes.

Bedingung für die Identifizierung dieser diagnostischen Fragmente ist eine massenspektrometrische Detektion mit Hochauflösung ohne low-mass cut-off, wie sie durch weit verbreitete Quadrupol-Orbitrap und Quadrupol-Time of Flight-Massenspektrometer gegeben ist. Inwieweit sich Immoniumionen des Phospholysins auch in größeren Peptiden, bei denen die Modifikation zentral im Peptid vorliegt, nachweisen lässt, muss noch gezeigt werden. Einen zuverlässigen Indikator für die Existenz eines lysinphosphorylierten Peptides stellen sie jedoch bereits dar.

3.5.2.6 Phosphoimmonium getriggerte EThcD zur Identifizierung von pLys-Peptiden

Das Auftreten eines der beiden pLys-Immoniumionen innerhalb eines hochauflösten HCD-Spektrums ist ein deutlicher Hinweis für eine Lysinphosphorylierung innerhalb des Peptides. Gilt es jedoch den Nachweis einer neuen endogenen PTM zu erbringen, so ist ein Fragmentspektrum mit lückenloser Sequenzabdeckung unter Erhalt der Lysinphosphorylierung erforderlich. Darüber hinaus lässt sich eine sichere Unterscheidung mehrerer Lysinreste innerhalb eines Peptides, wie es z.B. bei Peptiden des Histon H1 gegeben ist, nicht mit HCD realisieren. Beiden Herausforderungen ist die EThcD-Fragmentierung gewachsen. Möchte man die Vorteile beider Fragmentierungstechniken effizient miteinander kombinieren, so drängt sich die Entwicklung einer hochselektiven datenabhängigen Aufzeichnungsmethode auf. Diese sieht vor, dass im ersten Schritt die Schnelligkeit und Empfindlichkeit der HCD Fragmentierung dazu genutzt wird, um möglichst viele Phosphopeptide zu identifizieren. Im Falle der Detektion eines der beiden pLys-Immoniumionen wird ein zusätzliches EThcD MS/MS Spektrum des gleichen Precursorions generiert. Diese Strategie umfasst ideale Voraussetzung zur Charakterisierung des Phosphoproteoms und beinhaltet gleichzeitig optimale Bedingungen zur

Identifizierung von Lysinphosphorylierungen. Wie diese Strategie im Detail umgesetzt wurde, wird im folgendem diskutiert (vgl. Abbildung 71).

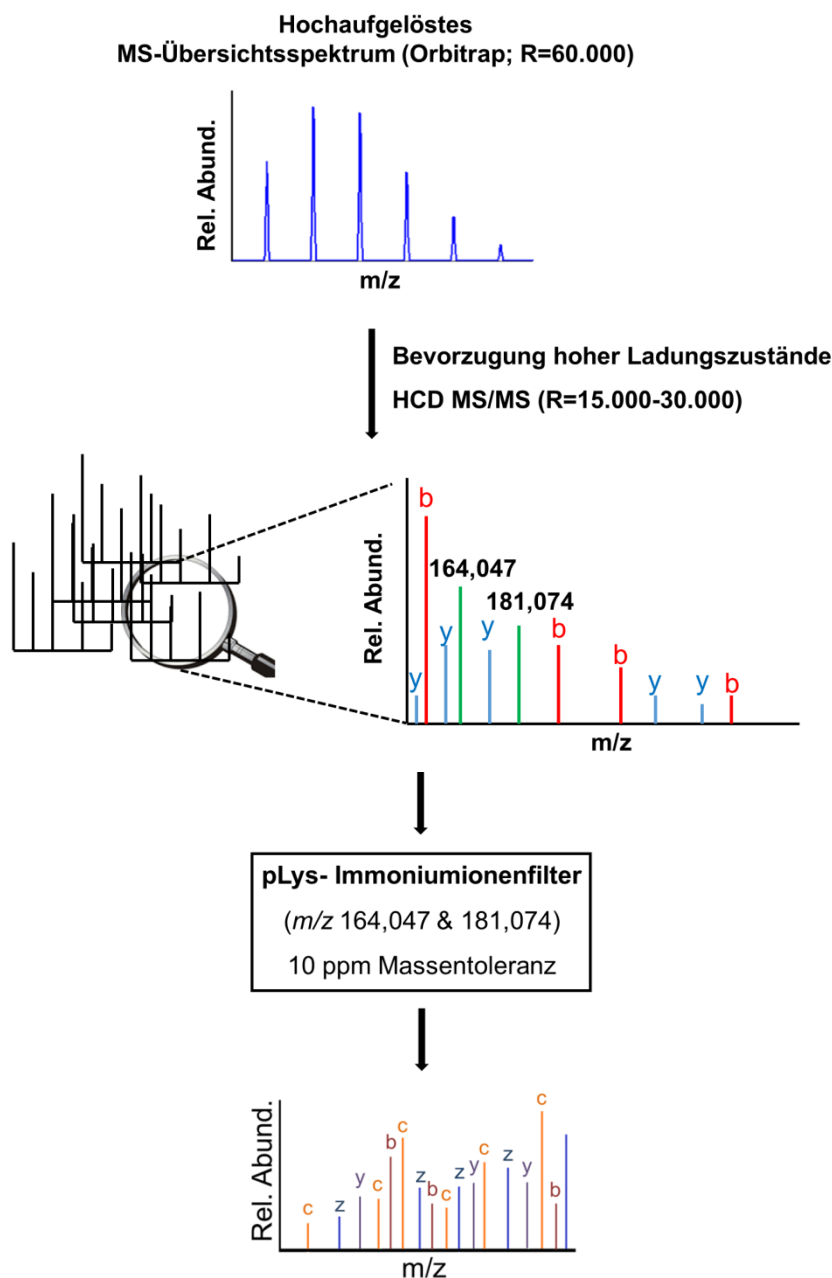


Abbildung 71: Schematische Darstellung des datenabhängigen pLys-Immoniumionen getriggerten ETHCD-Ansatzes.

Nach einem hochaufgelösten MS¹ werden in einer datenabhängigen Aufzeichnung mit hoher Geschwindigkeit möglichst viele Precursorionen mittels HCD hochaufgelöst erfasst (HCD-Filterscan), wobei bei Peptiden mit verschiedenen Ladungszuständen der höhere bevorzugt wird. Sobald eines der diagnostischen pLys-Immoniumionen (m/z 164,047 oder 181,074) innerhalb eines m/z -Fensters von ± 10 ppm auftritt, wird ein zusätzliches ETHCD-Spektrum des gleichen Precursorions aufgezeichnet.

Die Methodik beruht im Wesentlichen auf der zuverlässigen Erkennung des pLys-Immoniumions während der HCD-Fragmentierung. Diese ist nur durch Detektion der Fragmentspektren in der Orbitrapzelle möglich, sodass die parallele Aufzeichnung des MS^1 in der Orbitrap und der MS^2 in der Ionenfalle nicht mehr möglich ist. In einer solchen high-high-Methode (MS^1 und MS^2 werden hochaufgelöst gemessen) wurde daher die Scanzeit für das MS^1 durch Reduktion der Auflösung von 120.000 auf 60.000 halbiert. Die darin erkannten Precursorionen werden einer Fragmentierung unterzogen. Tritt ein Peptid in verschiedenen Ladungszuständen auf, wird der höhere unabhängig von der Intensität bevorzugt. Die HCD-Fragmentierung wird mit gebräuchlichen NCEs von 30 bis 32% durchgeführt, um sowohl die allgemeine Identifizierung von Phosphopeptiden zu ermöglichen, als auch Immoniumionen erfassen zu können. Anfangs wurden die HCD Spektren mit einer Auflösung von 15.000 aufgezeichnet. Der Ionentransfer und die Messung der Fragmente nehmen ca. 22,5 ms in Anspruch.

Zur gleichen Zeit werden Precursorionen für das nächste MS^2 gesammelt. Es kann jedoch durchaus sein, dass hochabundante Signale den Targetwert früher erreichen. Um den Zeitraum daher ideal zu nutzen, wurde es hochabundanten Precursorionen erlaubt, den vorgegebenen Targetwert zu überschreiten und die 22,5 ms als Injektionszeit zu verwenden. Eine genaue Betrachtung der Injektionszeiten der identifizierten Peptide zeigt, dass in der Regel Injektionszeiten über 50 ms benötigt werden, sodass eine Erhöhung der Auflösung des MS^2 auf 30.000 angezeigt ist. Bei dieser Auflösung stehen für die parallele Injektion 54 ms zur Verfügung. Diese Konditionen stellen einen guten Kompromiss zwischen einer guten Empfindlichkeit und einer ausreichenden Schnelligkeit dar.

Eine ideale Nutzung von Scan- und Injektionszeit wäre bei einer dynamischen Abstimmung beider Parameter aufeinander gegeben. Angenommen es gilt ein relativ niedrig abundantes Precursorion zu sammeln. In diesem Fall würde die maximale Injektionszeit von 100 ms zum Erreichen des Targetwertes komplett ausgereizt werden. In diesem Fall sollte die Scanzeit des vorangegangenen MS^2 nicht bei einer Auflösung von $R=30.000$ enden, sondern die Aufzeichnung des Transients verlängert werden, sodass Auflösungen $R>60.000$ erreicht werden würden. Diese Strategie würde die maximal mögliche Parallelität zwischen der Sammlung von Precursorionen und der Detektion von Fragmentationen ermöglichen und bei gleichbleibend hoher Geschwindigkeit die Spektrenqualität erhöhen. Da in einer datenabhängigen Top N-Methode in einem Zyklus die niedrig abundanten Precursorionen zuletzt erfasst werden, hätte dies zur Folge, dass insbesondere diese MS^2 -Spektren mit der höchsten Auflösung detektiert werden würden. Diese Eigenschaft ist ein wichtiger Aspekt um neue, niedrig abundante Peptidspezies zu erkennen. Die technologischen Voraussetzungen sind dafür bereits gegeben, die Steuerung dieser komplexen Vorgänge lässt sich jedoch noch nicht realisieren.

Mit der auf Schnelligkeit und Empfindlichkeit optimierten HCD-Technik werden so viel wie möglich Precursorionen erfasst. Weist eines dieser Spektren eines der pLys-Immoniumionen auf, wird ein zusätzlicher EThcD-Scan getriggert. Die hohe Massengenauigkeit des hochaufgelösten MS^2 ermöglicht es dabei den Massenfehler auf wenige ppm zu begrenzen. Innerhalb des kleinen m/z -Fensters und angesichts der sehr niedrigen m/z -Werte dieser diagnostischen Fragmente, ist falschpositives Triggering

nahezu ausgeschlossen. Demnach ist die zu erwartende Anzahl an triggerten EThcD-Spektren sehr gering. Im Umkehrschluss bedeutet dies, dass für den zusätzlichen EThcD-Scan hohe Targetwerte in Kombination mit sehr langen Injektionszeiten und hohen Auflösungen gewählt werden können, um die maximale Empfindlichkeit erzielen zu können ohne entscheidend an Schnelligkeit zu verlieren. Besteht zusätzlich ein Interesse an der Identifizierung labiler Histidinphosphorylierungen, so ist die Implementierung des entsprechenden Phosphoimmoniumions (m/z 190,037) in die Methode möglich.

3.5.2.7 Vergleich von Verfahren zur Anreicherung labiler Phosphorylierungen

Mit den Entwicklungen der hochselektiven pLys-Immoniumionen-Trigger-Methode und einer zweckmäßigen Fraktionierungsmethode für labile Phosphorylierungen war die Basis für einen Vergleich verschiedener Anreicherungsverfahren für labil phosphorylierte Peptide gegeben. Bei dem Methodenvergleich wurden jeweils ca. 2 mg Peptide einer HeLa-Zellkultur eingesetzt. Eines der Verfahren beruhte auf einer starken Anionenaustauschchromatographie (SAX). Als mobile Phase wurden Puffer aus Ammoniumacetat und Triethylammoniumphosphat, welche auf einen pH-Wert von 6,8 eingestellt wurden, eingesetzt, sodass die Trennung unter relativen „milden“ Bedingungen erfolgte. Um unspezifische hydrophobe Wechselwirkungen zu reduzieren, wurden 10% Acetonitril (ACN) hinzugefügt. Die Fraktionierung der Peptide lässt sich automatisieren, einfach überwachen und ist reproduzierbar. Die anschließende Entsalzung der Fraktionen ist jedoch mit einem erheblichen Arbeitsaufwand verbunden. Der überwiegende Teil der Peptide erfährt nur eine geringe Retention auf der Säule und wird in den ersten Fraktionen gesammelt. Dies gilt es bei der folgenden nanoLC-MS zu berücksichtigen. Für die Studie dieses Anreicherungsverfahrens wurden alle Fraktionen und die Injektionsvolumina der ersten Fraktion entsprechend angepasst. Phosphorylierte Peptide erfahren eine stärkere Retention auf der SAX-Säule als unphosphorylierte und können demnach abgetrennt werden. Im Gegensatz dazu wechselwirken Peptide mit sauren Aminosäuresequenzen ebenfalls stark mit der stationären Phase, sodass eine Differenzierung gegenüber Phosphopeptiden nicht möglich ist.

Als zweites Verfahren wurde ein modifiziertes auf TiO_2 -Anreicherung basierendes Protokoll eingesetzt. Es sieht eine Anreicherung unter schwach sauren Bedingungen vor. In einem Batchverfahren erfolgt in diversen TiO_2 -Zyklen eine kontinuierliche Abreicherung hochabundanter Peptide und eine Anreicherung von Phosphopeptiden. Der Arbeitsaufwand ist vergleichbar mit der SAX-Anreicherung. Für die Beladung der TiO_2 -Beads werden saure pH-Werte von 2,7 oder 3,2 eingesetzt. Die milderen Bedingungen reduzieren das Risiko der Hydrolyse labiler Phosphorylierungen, erhöhen jedoch gleichzeitig die Anzahl an gebundenen Peptiden mit sauren Aminosäureabschnitten. Das Protokoll wurde bereits erfolgreich bei der Anreicherung labiler Argininphosphorylierungen im Phosphoproteom von *S. aureus* eingesetzt.³⁶ Inwieweit sich diese Ergebnisse auf die komplexeren humanen Proteome übertragen lassen, musste untersucht werden.

Als letztes wurde das Potential eines IMAC-basierten Verfahrens untersucht. Für die Anreicherung wird das Peptidgemisch vor der Trennung auf einem pH-Wert von 2,3 gebracht. Danach wird die Säule mit einer niedrigen Flussrate unter sauren Bedingungen mit den Peptiden beladen. Im Anschluss wird die Säule unter einer erhöhten Flussrate gewaschen. Um hydrophobe Wechselwirkungen zu reduzieren wurde der Wasch- und Transportlösung 30% Acetonitril hinzugefügt. Aufgrund des niedrigen pH-Wertes (<3) ist eine Differenzierung zwischen phosphorylierten Peptiden und sauren Aminosäuresequenzen realistisch. Insgesamt befinden sich die Peptide über einen akzeptablen Zeitraum von ca. 12 min in saurer Lösung. Für die Elution der gebundenen Phosphopeptide wird auf eine Ammoniaklösung gewechselt und eine Fraktion aufgefangen. Bevor die basische Komponente das System verlässt, wird bereits ein Teil der sauren Lösung gesammelt und vorgelegt, sodass das finale Eluat ein pH-Wert von 8 aufweist (vgl. Abbildung 72). Diese Erweiterung des Intervalls gewährleistet, dass die Peptide nach dem Verlassen der Anlage unter idealen Bedingungen gelagert sind und gleichzeitig erhöht sie die Robustheit des Verfahrens, da somit Schwankungen im Retentionsverhalten kompensiert werden können. Von Nachteil ist, dass sich das Volumen des Eluats vergrößert, sodass für das anschließende Einengen in der Vakuumzentrifuge eine Aliquotierung vorgenommen werden muss.

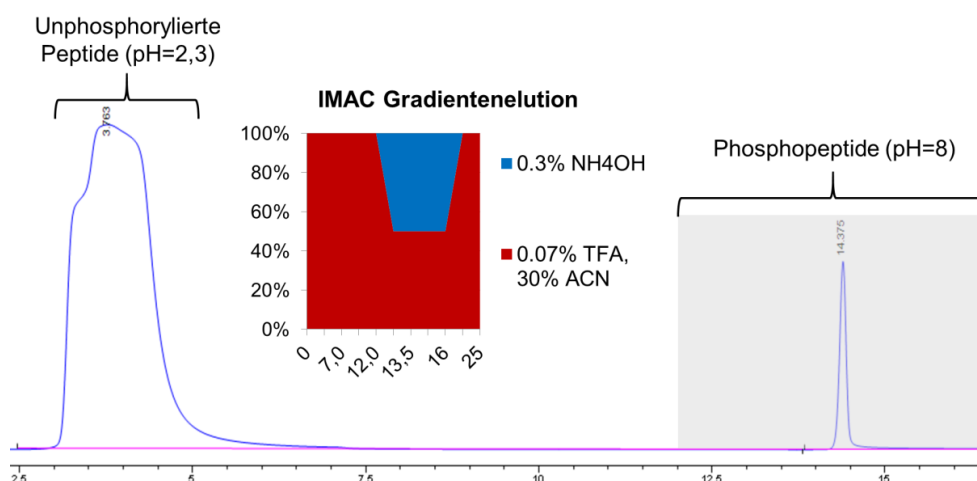


Abbildung 72: Chromatogramm und Gradient der IMAC-Phosphopeptidanreicherung eines HeLa-Proteoms.

Die unphosphorylierten Peptide haben eine geringe Wechselwirkung mit der stationären Phase und verlassen die HPLC frühzeitig. Um sicher zu stellen, dass alle angereicherten Phosphopeptide aufgefangen werden und ein pH-Wert von acht eingestellt ist, wird über einen relativ langen Zeitraum das Eluat gesammelt.

Prinzipiell lässt sich das Verfahren sehr gut automatisieren, beobachten und reproduzieren. Da die Probe vor der Anreicherung angesäuert wird, sind jedoch lange Sequenzen aufeinanderfolgender Anreicherungen labiler Phosphorylierungen in Abwesenheit nicht möglich. Allgemein beansprucht dieses Verfahren den geringsten Arbeitsaufwand aller untersuchten Ansätze. Das Potential dieses Verfahrens wurde bereits in einer Phosphoproteomstudie von *E. coli* demonstriert, wobei ca. 200 Histidinphos-

phorylierungsstellen identifiziert wurden. Ob sich vergleichbare Ergebnisse bei komplexeren humanen Proteomen erzielen lassen, galt es zu untersuchen.²⁶

Abbildung 73 ist zu entnehmen, dass mit der IMAC-Anreicherung die meisten Phosphopeptide nachgewiesen werden konnten. Mit einer einzelnen Messung mit Hilfe der pLys-Immoniumionen-Triggermethode gelang der Nachweis von ca. 7000 Phosphopeptiden, wobei die phosphorylierten Peptide 96,4% aller identifizierten Peptide einnahmen. Es wurden jedoch nur sehr wenige ETHCD-Spektren getriggert und der Nachweis einer Lysinphosphorylierung gelang nicht.

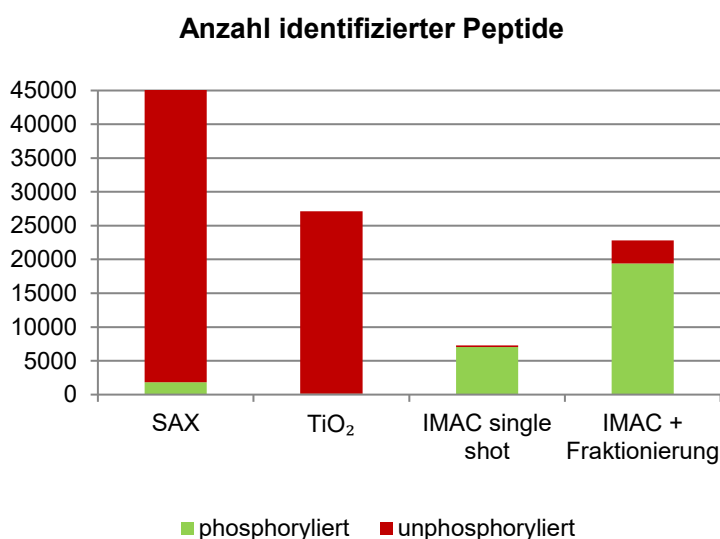


Abbildung 73: Vergleich verschiedener Verfahren zur Anreicherung von Phosphopeptiden.

Ein weiteres Aliquot dieser Anreicherung wurde mit einer MS-Methode analysiert, bei der das Triggern auf dem Neutralverlust von 80 Da beruhte. In diesem Fall wurden ca. 4900 Phosphopeptide von 5000 Peptiden erkannt. Der Anteil an phosphorylierten Peptiden war demnach sehr hoch, jedoch sank die Gesamtzahl an identifizierten Phosphopeptiden. Dies lag in der sehr hohen Anzahl an getriggerten ETHCD-Spektren begründet, welche zu einer geringeren Gesamtanzahl an aufgezeichneten MS² führte. Die ursprüngliche Annahme, dass bevorzugt labile Phosphorylierungen den Neutralverlust von 80 Da aufweisen, war anhand dieses Experiments in dem überwiegend Serin- und Threoninphosphorylierungen das Triggern verursachten, widerlegt worden. Aufgrund der vielversprechenden Ergebnisse des Einzellaufes wurde eine weitere Anreicherung mittels IMAC durchgeführt und diese mit Hilfe der RP-Fraktionierung bei pH=8 gesplittet. Die Verlängerung der LC-MS-Messzeit steigerte die Anzahl an identifizierten Phosphopeptiden auf ca. 19400, wobei ca. 85% aller identifizierten Peptide eine Phosphorylierung trug.

Ein detaillierter Vergleich der verschiedenen Fraktionen zeigte, dass über 92% aller identifizierten Peptide in einer oder zwei Fraktionen nachgewiesen wurden (vgl. Abbildung 74). Diese geringe Peptidüberlappung zwischen mehreren Fraktionen zeigt, dass das chromatographische Verhalten der überwiegend phosphorylierten Peptide ideal mit dem gewählten Intervall von 1 min pro Fraktion harmonisiert und die Peaks die entsprechenden Breiten aufweisen.

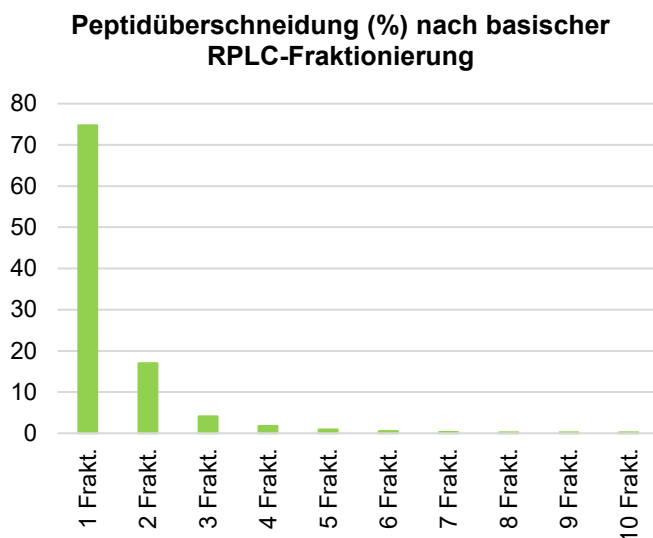


Abbildung 74: Peptidüberlappung nach IMAC-Anreicherung und Fraktionierung. Die überwiegende Mehrheit der Phosphopeptide wurde in einer oder zwei Fraktionen nachgewiesen. Diese geringe Überlappung zeigt, dass die Mehrzahl der Peptide mit Peakbreiten ≤ 1 min in der ersten Dimension eluieren.

Das SAX-basierte Verfahren und die TiO_2 -Anreicherung reichten nicht an die Leistungsfähigkeit des IMAC-Verfahrens heran. Im Gegenteil, mit ihnen konnte nur eine geringe Anzahl an Phosphopeptiden ($\text{SAX} \approx 1800$ & $\text{TiO}_2 \approx 130$) nachgewiesen werden. Der Hauptgrund dafür war die unzureichende Abtrennung unphosphorylierter Peptide. Ein Beleg dafür ist die Identifizierung von ca. 44.000 unphosphorylierten Peptiden in den SAX-Fractionen und ca. 27.000 unphosphorylierter Peptide in der Titanoxidanreicherung.

Eine endogene Lysinphosphorylierung wurde in keinem der drei Ansätze nachgewiesen.

3.5.3 Analyse labiler Phosphorylierungen in HEK293-Zellen

Unter Berücksichtigung der Ergebnisse aus den HeLa-Phosphoproteomstudien wurden phosphoproteomische Untersuchungen an HEK293-Zellen durchgeführt. Im Gegensatz zu den vorangegangenen Studien wurden vor dem Anreicherungsschritt jeweils fünf pLys und fünf pCys-Peptiden in Konzentrationen zwischen 500 und 1000 fmol, dem Peptidgemisch hinzugegeben. Die Proteine wurden verdaut und mittels TiO_2 und dem IMAC/Fraktionierungsverfahren untersucht. Des Weiteren wurde in die pLys-Immoniumionen-Triggermethode zusätzlich das pHis-Immoniumion als ein diagnostisches Fragment implementiert, um ein zusätzliches EThcD-Spektrum zu triggern.

Mit Hilfe der IMAC-Anreicherung und anschließender Fraktionierung wurden unter basischen Bedingungen über 35400 Phosphopeptide nachgewiesen. Interessanterweise befanden sich darunter nicht die zugesetzten Standardpeptide. Der überwiegende Teil an identifizierten Phosphopeptiden enthielt pSer, pThr und pTyr. Dennoch stellte der Ansatz sein Potential zum Nachweis endogener labiler Phosphorylierungen unter Beweis. So gelang der Nachweis verschiedener Cysteinsulfatierungen. Diese PTMs

werden während der Datenbanksuche fälschlicherweise als Cysteinphosphorylierungen mit einer relativ großen Massenabweichung nachgewiesen. Beispielweise wurde das cysteinmodifizierte Peptid NsCLTNFHHGMDLTR mit einer Massenabweichung von -6,8 ppm erkannt. Eine globale Betrachtung aller PSMs zeigte jedoch, dass der überwiegende Teil der zugeordneten Spektren eine Massenabweichung kleiner 2 ppm aufwies, sodass eine Phosphorylierung des Cysteinrestes ausgeschlossen werden konnte (vgl. Abbildung 75).

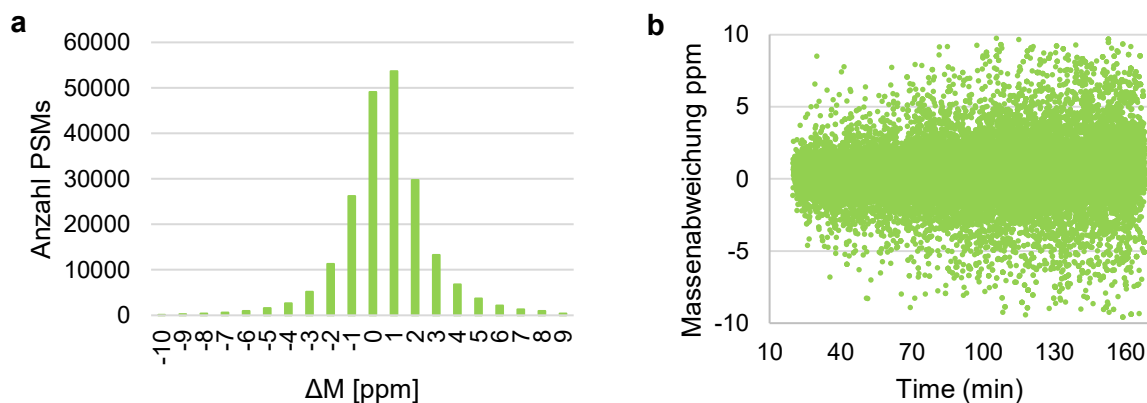


Abbildung 75: (a) Anzahl der PSMs und deren Massenabweichung. (b) Massenabweichung der PSMs in Abhängigkeit der Retentionszeit.

Jeder Datenpunkt entspricht einem PSM. Eine globale Betrachtung der PSMs zeigt, dass der überwiegende Teil der identifizierten Peptide eine Massenabweichung ≤ 2 ppm aufweist.

Proteine die Cysteinsulfatierungen trugen, waren z.B. das 40S ribosomale Protein S3a (RPS3A) an der Position Cys-96 und das heterogene Nuclearrribonucleoprotein (HNRNPD) an der Position Cys-226. RPS3A bindet unter anderem an nicht translatierte mRNA-Regionen (5'-UTR) und an RNA.^{292, 293} HNRNPD steht im Zusammenhang mit DNA- und Chromatinbindung. Es bindet mit hoher Affinität an RNA-Moleküle, welche vermehrt AU-Bestandteile enthalten.²⁹⁴ Diese wiederum werden in zahlreichen proto-onkogenen und zytokiner mRNA gefunden.²⁹⁵ Außerdem wurde eine spezifische Wechselwirkung mit einzel- und doppelsträngiger DNA nachgewiesen, wobei es als Transkriptionsfaktor fungiert. Außerdem spielt es eine Rolle bei der rhythmischen Expression zirkadianer Uhr gene. Es bindet an die nicht translatierte Region (3'UTR) der Cryptochrome 1 (Cry1) mRNA und bewirkt die rhythmische Translation von Cry1. Interessanterweise geschieht dies in Wechselwirkung mit Initiationfaktoren, welche die 40S ribosomale Untereinheit für die Translation rekrutieren.²⁹⁶

Studien von Proteinsulfatierungen beschränkten sich bislang vor allen Dingen auf Tyrosinreste. So wurde gezeigt, dass Tyrosinsulfatierungen vorwiegend bei sekretorischen oder membrangebundenen Proteinen auftreten und extrazelluläre Protein-Protein-Interaktionen beeinflussen. Die Übertragung des Sulfatrestes erfolgt dabei von Phosphoadenosinphosphosulfat (PAPS) mittels Tyrosyl-Sulfotransferasen innerhalb des Golgi-Apparates.²⁷⁸ Endogene Cysteinsulfatierungen sind bis dato nicht dokumen-

tiert und demzufolge deren Funktion unbekannt. Für die Analyse von Cysteinphosphorylierungen ist die Existenz dieser Modifikation ebenfalls von großer Bedeutung. Nur auf Basis einer hohen Massengenauigkeit und einer ganzheitlichen Betrachtung der einzelnen Messung, wie im oberen Beispiel demonstriert, ist eine zweifelsfreie Differenzierung beider Spezies gegeben.

Darüber hinaus wurden Aspartatphosphorylierungen der Amylase-alpha 1 (AMY1A) an Position D128 und der Isozitatdehydrogenase Untereinheit Gamma (IDH3G) an Position Asp-85 nachgewiesen. AMY1A ist ein Enzym, das in der Lage ist 1-4- α -D-glykosidische Bindungen zu spalten.²⁹⁷ IDH3G sorgt für die allosterische Regulation, des Enzyms, welches die Decarboxylierung von Isozitat zu α -Ketoglutarat katalysiert.²⁹⁸

Ferner wurde eine Phosphorylierung des Argininrestes Arg-314 des Zinkfinger-FYVE-domäne-enthaltenden Proteins 26 (ZFYVE26) beobachtet. Dieses Protein ist in der Lage Phosphatidylinositol-3-phosphat zu binden und wird für den Abspaltungsschritt während der Zytokinese benötigt.²⁹⁹

Außerdem wurde bei einer Retentionszeit von 25,17 min in einem HCD-Scan ein kleines Signal mit einem m/z -Verhältnis von 190,036 detektiert, welches somit innerhalb des zugelassenen Massenfehlers von 10 ppm für ein pHis-Immoniumion lag, sodass ein zusätzliches EThcD-Spektrum desselben Precursorions generiert wurde (vgl. Abbildung 76).

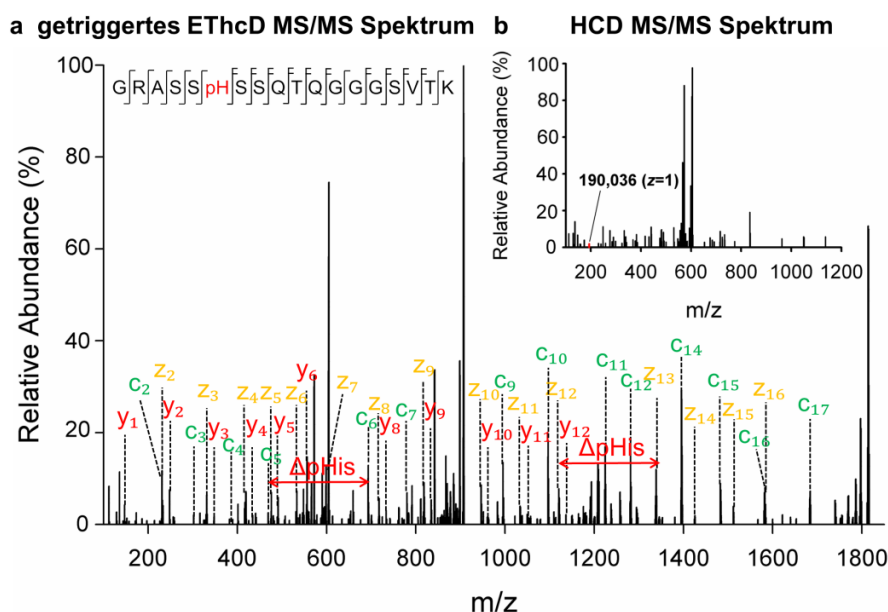


Abbildung 76: Nachweis der endogenen Histidinphosphorylierung von Premalin-A/C.

(a) Getriggertes EThcD-Spektrum mit dazugehöriger Sequenzabdeckung des histidinphosphorylierten Peptides GRASSpHSSQTQGGSVTK. Die y-Serie ist lückenlos, bricht allerdings an der Position der labilen Modifikation ab. Dieser Bereich wird durch c- und z-Ionen abgedeckt, sodass eine eindeutige Unterscheidung der fünf benachbarten potentiellen Phosphorylierungsstellen möglich ist. (b) HCD-Spektrum, welches das pHis-Immoniumion enthielt und das EThcD-Spektrum triggerte.

Dieses Spektrum wies eine lückenlose Sequenzabdeckung auf und lokalisierte eindeutig die Histidinphosphorylierung an Position His-6 im Peptid (Sequest Xcorr score: 8,40 & *ptmRS* Positionswahr-

scheinlichkeit >99%). Hervorzuheben ist, dass sich in Richtung des *N*- und *C*-Terminus der Histidinphosphorylierungsstelle jeweils zwei Serinreste innerhalb der Peptidsequenz (GRASSpHS-SQTQGGGSVTK) befanden. Dennoch war eine zweifelsfreie Zuordnung dieser äußerst labilen Phosphorylierung möglich.

Das Peptid war Bestandteil des Proteins Premalin-A/C (LMNA) und weist die Histidinphosphorylierung an der Stelle His-405 nach. Lamin A und C sind Bestandteil der Kernlamina von Säugern und spielen eine wichtige Rolle beim Aufbau des Zellkerns, der strukturellen Organisation des Chromatins und der Kernmembran. Des Weiteren sind sie ein essentieller Bestandteil bei der Entwicklung des peripheren Nervensystems, der Skelettmuskulatur und dessen Proliferation.^{300, 301}

Die PSMs, welche für den Nachweis der labilen Modifikationen herangezogen wurden, sind dem Anhang zu entnehmen. Besteht ein weitergehendes Interesse an den identifizierten PTMs, so ist ein Abgleich mit synthetischen Referenzpeptiden angezeigt.

Obwohl auch dieser Ansatz den ersten Nachweis einer endogenen Lysinphosphorylierung schuldig blieb, so untermauern die gezeigten Beispiele die Leistungsfähigkeit der HCD-Immuniumionen-Triggermethode, große Teile des Phosphoproteoms adäquat abzubilden, ohne Kompromisse in Bezug auf die sichere Erkennung der äußerst labilen Lysin- und Histidinphosphorylierungen eingehen zu müssen.

3.6 Tandem-MS von pyrophosphorylierten Peptiden

In vitro Markierungsstrategien haben in den vergangenen Jahren zur Identifizierung einiger Proteinpyrophosphorylierungen in Hefe und Säugerzellkulturen geführt.^{23, 49, 50} Um die biologische Relevanz dieser PTMs zu untersuchen, wurde ein Anreicherungsverfahren und ein Syntheseansatz zur Darstellung von pyrophosphorylierten Peptiden entwickelt (vgl. Kapitel 1.1.3 & 1.2.3.).^{74, 143} Der direkte Nachweis, dass die Proteinpyrophosphorylierung *in vivo* existiert, ist jedoch bislang nicht gelungen.

Die Gründe dafür sind vielfältig: Zum einen ist die Modifikation in polysaure Aminosäuresequenzen eingebettet. Zum anderen enthalten pyrophosphorylierte Aminosäuresequenzen meist diverse potentielle Modifizierungsstellen. Die größte analytische Herausforderung besteht allerdings darin, pyrophosphorylierte Peptide von ihren diphosphorylierten Gegenspielern gleicher Aminosäuresequenz zu unterscheiden. Vor diesem Hintergrund wurde im Labor von Prof. Fiedler durch Dr. Yates eine Auswahl bereits charakterisierter und potentiell pyrophosphorylierter Peptidsequenzen und deren doppelt phosphorylierte Gegenspieler synthetisiert und mittels HPLC-MS/MS charakterisiert (vgl. Abbildung 77).

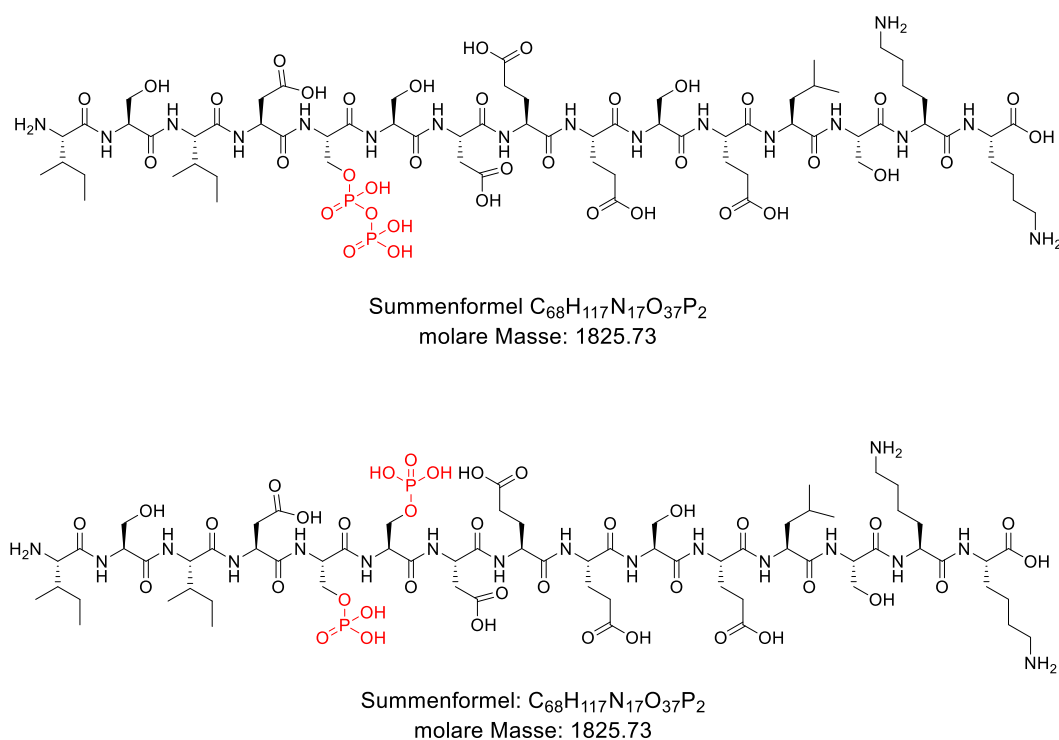


Abbildung 77: Beispiel für isobare pyro- und diphosphorylierte Peptide.

Die abgebildete Peptidsequenz stammt aus dem Protein Puf6 (Pumilio-homology domain family) aus dem Proteom von *S. cerevisiae*. Puf6 wurde bereits in der Literatur als doppelt phosphoryliert an den Positionen Ser-34 und Ser-35 beschrieben und stellt eine mögliche *in vitro* Pyrophosphorylierungsstelle dar.^{50, 302}

3.6.1 Chromatographisches Verhalten pyro- und diphosphorylierter Peptide

Chromatographische Trennungen mittels RP-Chromatographie haben gezeigt, dass di- und pyrophosphorylierte Peptide ein ähnliches Verhalten aufweisen. Beide Spezies erfuhren eine ausreichende Retention unter diesen Bedingungen, wiesen jedoch erheblich größere Peakweiten im Vergleich zu unmodifizierten oder einfach phosphorylierten Peptiden auf. Während in einem gebräuchlichem nanoLC-Gradient mit einer Trennzeit von 60 min Peakhalbwertsbreiten von ca. 6-7 Sekunden für unmodifizierte Peptide erreicht werden, wurden für die multipel phosphorylierten Peptide Breiten von 20 Sekunden bis hin zu mehreren Minuten detektiert. Dies war für die Identifizierung von pyrophosphorylierten Peptiden von besonderem Interesse, da bei gleich bleibender Peakfläche die Signalintensität durch eine Peakverbreiterung sinkt. Gilt es äußerst niedrig abundante Precursorionen zu identifizieren, könnten somit deren Signalintensitäten nicht ausreichen, um diese zu erfassen.

Ein weiterer, wichtiger Aspekt waren die Retentionszeiten beider isobarer Spezies. Diese unterschieden sich für die untersuchten Paare nur um 20-30 Sekunden, wobei bei allen Paaren das disphosphorylierte Peptid früher eluierte (vgl. Abbildung 78).

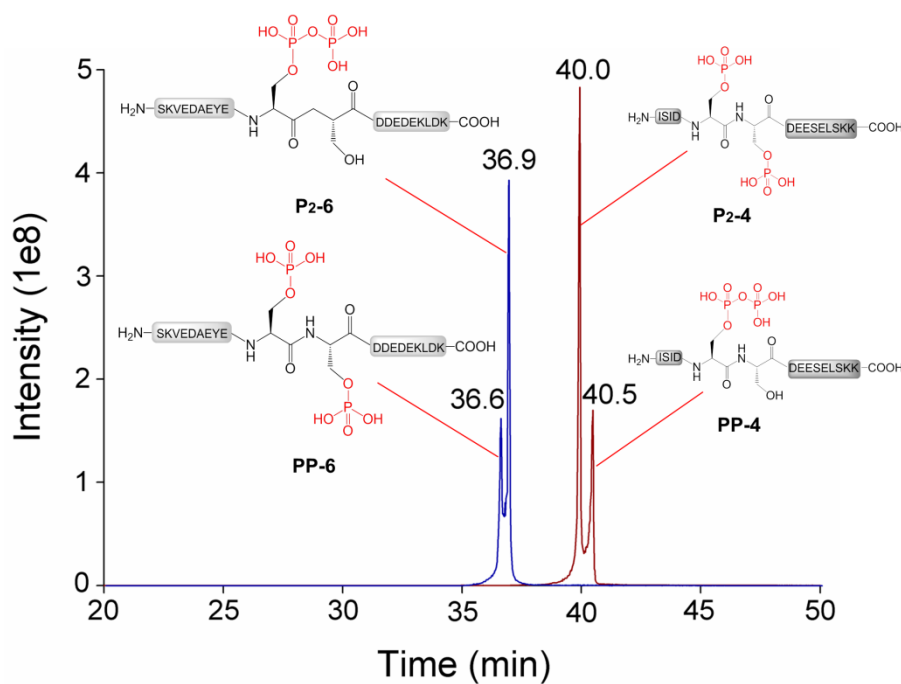


Abbildung 78: Chromatographisches Verhalten von di- und pyrophosphorylierten Peptiden.

Reversed-phase Chromatographie der Peptide P2-4 und PP-4 sowie P2-6 und PP-6. Es sind die jeweiligen extrahierten Ionenchromatogramme sowie die Retentionszeit der einzelnen Peaks dargestellt. Die isobaren Peptide eluieren innerhalb einer halben Minute und sind nicht basisliniengetrennt.

Dieses Ergebnis hat weitreichende Folgen: In einem phosphoproteomischen *bottom-up*-Ansatz werden die Peptide mit Hilfe der datenabhängigen Aufzeichnung erfasst. Um hochabundante Precursorionen,

welche große Peakbreiten aufweisen, nicht mehrfach zu fragmentieren, werden diese nach ihrer Erfassung für einen bestimmten Zeitraum von weiteren Fragmentierungen ausgeschlossen (dynamische Ausschlusszeit, vgl. Kapitel 1.2). Diese dynamische Ausschlusszeit beträgt allgemein 40-60 Sekunden. Daraus resultiert, dass in einem ungezielten phosphoproteomischen Ansatz zwar das diphosphorylierte Peptid fragmentiert werden würde, aber aufgrund der sehr ähnlichen Retentionszeiten die pyrophosphorylierte Spezies nicht erfasst werden würde, sollten beide Spezies gleichzeitig auftreten. Dies kann nur durch eine Verkürzung der dynamischen Ausschlusszeit auf 15-20 Sekunden umgangen werden. Im Umkehrschluss erfordert dies eine äußerst schnelle und empfindliche Fragmentierungstechnik. Der Einsatz kurzer dynamischer Ausschlusszeiten war aus einem weiteren Grund von Relevanz. Die ähnlichen Retentionszeiten und relativ großen Peakbreiten verhinderten eine chromatographische Basislinientrennung beider Spezies, sodass große Teile der Peakflächen überlappten. Die in diesen Bereichen generierten MS/MS-Spektren beinhalteten Fragmentationen beider Spezies, sodass eine zweifelsfreie Unterscheidung erschwert war. Kurze Ausschlusszeiten kombiniert mit einer schnellen Fragmentierungstechnik erlaubten es beide Precursorionen mehrfach zu fragmentieren und das Precursorion des pyrophosphorylierten Peptides in der zweiten Peakhälfte oder im Tailing zu erfassen.

3.6.2 HCD-Fragmentierung pyro- und diphosphorylierter Peptide

Nach der chromatographischen Trennung erfolgt die Ionisierung der Peptide mittels nanoESI im positiven Modus mit Sprayspannungen zwischen 2,1 und 2,4 kV. Unter diesen Ionisierungsbedingungen konnte keine Hydrolyse pyrophosphorylierter Peptide beobachtet werden. Es konnten jedoch erhebliche Eisenaddukte der pyrophosphorylierten Peptide detektiert werden, sodass auf den Einsatz von Metallsprayern verzichtet wurde.

Nach der erfolgreichen Ionisierung wurden die Peptide mit Hilfe eines scanneden Quadrupols isoliert und verschiedenen MS/MS-Experimenten unterzogen. Es gilt an dieser Stelle noch einmal hervorzuheben, dass sich di- und pyrophosphorylierte Peptide gleicher Aminosäuresequenz nur in einer diagnostischen Fragmentation je Ionenserie voneinander unterscheiden, sodass eine Fragmentierungstechnik benötigt wurde, welche in der Lage war, beide Spezies zu fragmentieren und eine sehr hohe Sequenzabdeckung zu generieren ohne dabei jedoch einen signifikanten Neutralverlust der Modifikation hervorzurufen.

Wie bereits ausführlich in Kapitel 1.2.5.2 beschrieben, deckt die HCD-Fragmentierung einen Großteil phosphoproteomischer Fragestellungen ab. Angesichts dessen wurden HCD-Fragmentierungsexperimente der synthetischen Peptide vorgenommen. Und in der Tat wiesen HCD-Spektren von pyro- und diphosphorylierten Peptiden eine hohe Ausbeute an b- und y-Fragmentationen, welche aus einer effizienten Spaltung des Peptidrückrates resultierten, auf.

Exemplarisch dafür ist das HCD-Fragmentspektrum des Peptides PP-4 dargestellt. Die Abbildung 79 verdeutlicht, dass HCD es erlaubte, eine lückenlose Sequenzabdeckung zu generieren. Somit war eine sichere Identifizierung der Aminosäuresequenz des Peptides gewährleistet. Desweiteren wird deutlich, dass zahlreiche Fragmentationen detektiert wurden, welche den labilen Pyrophosphatrest (PP) verloren haben. Da das untersuchte Peptid diverse potentielle Phosphorylierungsstellen in Form von Serinresten aufweist und diese zum Teil benachbart sind, war eine zweifelsfreie Unterscheidung zwischen pyro- und diphosphorylierten Peptiden gleicher Aminosäuresequenz und eine exakte Lokalisierung der Modifizierungsstelle jedoch nicht möglich.

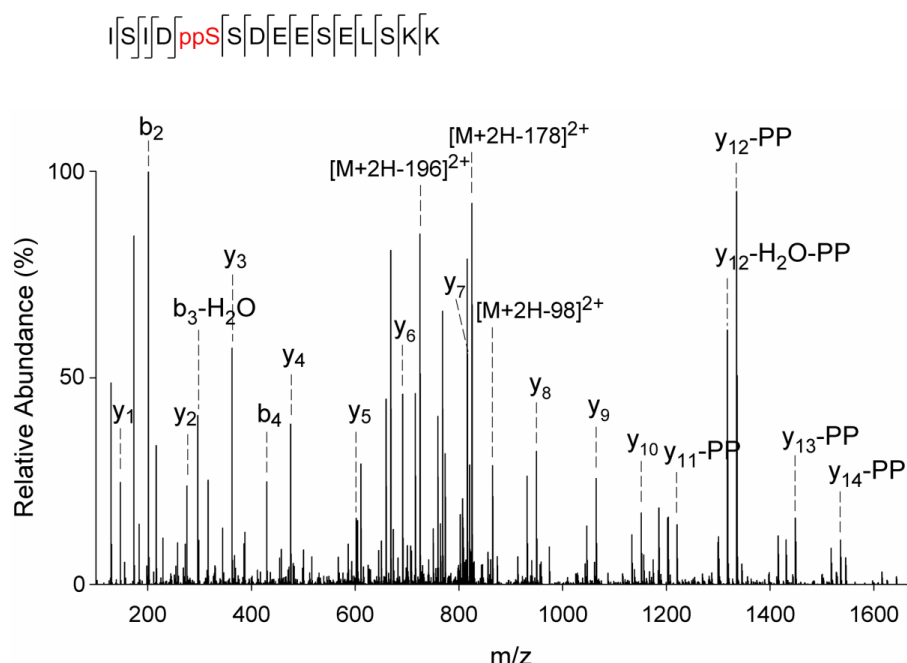


Abbildung 79: HCD MS/MS Fragmentspektrum des Peptides ISIDppSSDEESELKK PP-4.

Eine hohe Sequenzabdeckung ermöglicht die Identifizierung der Aminosäuresequenz. Substanzieller Neutralverlust der Pyrophosphorylierung verhindert jedoch deren korrekte Identifizierung und Positionsbestimmung.

Zusätzlich weist das Spektrum verschiedene Neutralverluste von 98, 178 und 196 Da von dem Precursorion auf. Dieses Muster wurde auch in Fragmentspektren weiterer pyrophosphorylierter Peptide wiedergefunden, ließ sich jedoch nicht auf alle untersuchten Peptide und Ladungszustände übertragen. Insbesondere bei Precursorionen, welche im dreifachen Ladungszustand fragmentiert wurden, konnte dieses Triplet nicht reproduzierbar detektiert werden. Ein für die Pyrophosphorylierung eines Peptides charakteristisches Phosphoimmoniumion wurde nicht erfasst.

3.6.3 CID-Fragmentierung pyro- und diphosphorylierter Peptide

Zusätzlich zu HCD wurde das CID-Fragmentierungsverhalten von di- und pyrophosphorylierten Peptiden untersucht. Von der CID ist bekannt, dass sie im Vergleich zu HCD eine geringere Fragmentierung des Peptidrückgrates von phosphorylierten Peptiden hervorruft und hochabundante Signale, resultierend aus Neutralverlusten von phosphoriger Säure und Phosphorsäure, erzeugt (vgl. Kapitel 1.2.5.2). Dieses Verhalten spiegelte sich auch bei der Fragmentierung der synthetischen diphosphorylierten Peptide wieder. CID-MS/MS-Spektren dieser Peptide waren dominiert von Neutralverlusten von 98 Da und 196 Da, welche aus der Abspaltung von einem beziehungsweise zwei Molekülen Phosphorsäure resultierten (vgl. Abbildung 80). Die ladungsunabhängige β -Eliminierung unter Bildung eines Dehydroalanins ist ein potentieller Fragmentierungspfad, welcher die Eliminierung von einem oder zwei Molekülen Phosphorsäure beschreibt.³⁰³

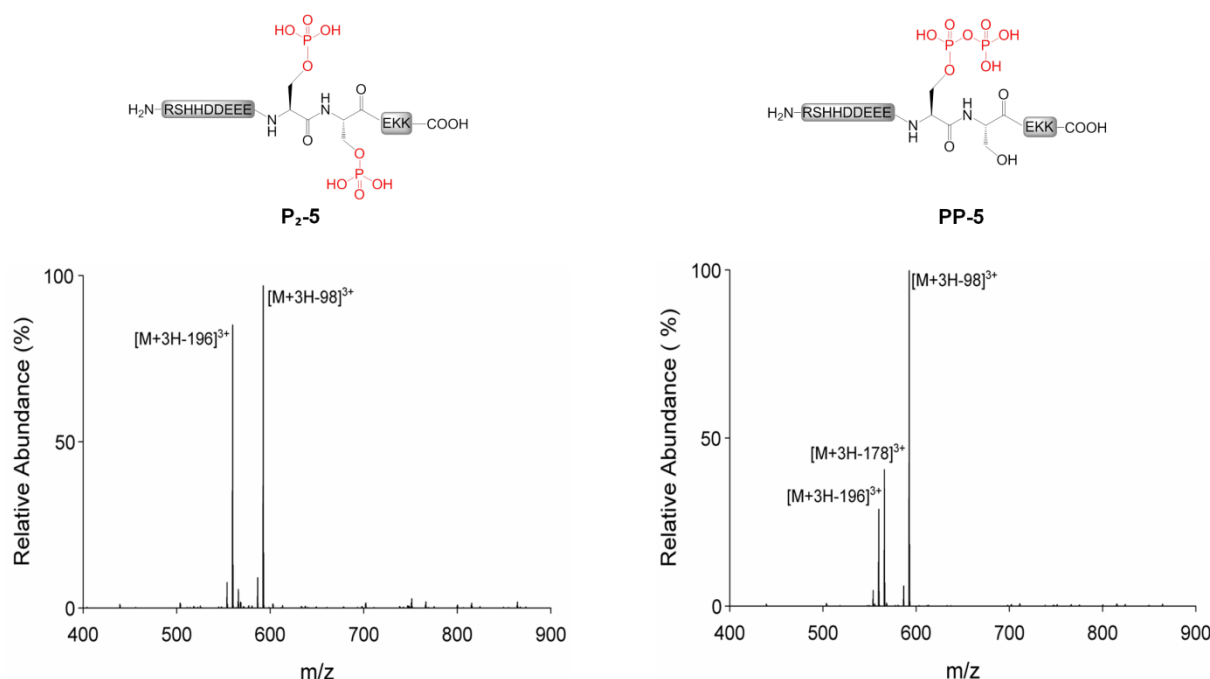


Abbildung 80: CID-MS/MS Spektren isobarer di- und pyrophosphorylierter Peptide.

Die Abbildung verdeutlicht das unterschiedliche Neutralverlustmuster der beiden Peptide P₂-5 und PP-5. Während das diphosphorylierte Peptid Neutralverluste von 98 und 196 Da aufweist, zeigt das pyrophosphorylierte Peptid einen zusätzlichen Neutralverlust von 178 Da.

Im Gegensatz zu den diphosphorylierten Peptiden zeigten die pyrophosphorylierten Peptide ein abweichendes Fragmentierungsverhalten. Zusätzlich zu den Neutralverlusten von 98 und 196 Da ließ sich reproduzierbar der Verlust von 178 Da mit hoher relativer Intensität detektieren (vgl. Abbildung 80). Dieser Neutralverlust stammte von der Abspaltung von pyrophosphoriger Säure (H₂P₂O₇) ab. Mit Hilfe hochauflösender CID-MS/MS Spektren, welche einen Neutralverlust von exakt 177,943 Da aufwiesen, konnte dies eindeutig nachgewiesen werden. Da der Neutralverlust von 178 Da

ausschließlich bei pyrophosphorylierten Peptiden und nicht bei diphosphorylierten Peptiden detektiert wurde, bestand die Möglichkeit der zweifelsfreien Differenzierung zwischen beiden isobaren Spezies mittels CID-MS/MS. Unabhängig davon kann dieses charakteristische Fragmentierungsverhalten als Indikator für die Existenz eines pyrophosphorylierten Peptides fungieren.

3.6.3.1 Faktoren die das Neutralverlustmuster beeinflussen

Übereinstimmend mit vorangegangenen Studien zum Fragmentierungsverhalten von Phosphopeptiden war das Ausmaß des Neutralverlustes abhängig von diversen Faktoren. Dazu zählen die Aminosäuresequenz des Peptides, die Aminosäure, welche die Phosphorylierung trägt, die angewandte Kollisionsenergie und der Ladungszustand der Precursorions.³⁰³⁻³⁰⁷

Nach der ESI ist es durchaus möglich, dass ein Peptid sowohl als doppelt als auch als dreifach geladenes Precursorion vorliegt. Betrachtet man das Fragmentierungsverhalten der unterschiedlichen Ladungszustände eines Peptides, so wird deutlich, dass CID-MS/MS Spektren von dreifach geladenen di- und pyrophosphorylierten Precursorionen im Vergleich zu doppelt geladenen Precursorionen einen deutlich höheren Anteil an sequenzgebenden Ionen und reduzierte Signalintensitäten für Neutralverluste aufweisen. Exemplarisch dafür sind in Abbildung 81 die Fragmentspektren der isobaren Peptide P₂₋₄ und PP-4 für die Ladungszustände zwei und drei dargestellt.

Die Abbildung verdeutlicht drei wesentliche Aspekte: Zum einen ist ersichtlich, dass unabhängig vom Ladungszustand des Precursorions die unterschiedlichen Neutralverlustmuster von di- und pyrophosphorylierten Peptiden auftreten (98 & 196 Da gegenüber 98, 178, 196 Da). Des weiteren zeigt die Abbildung, dass mit steigendem Ladungszustand der Anteil an Fragmentierungen entlang des Peptidrückgrates zunehmen und somit mehr Informationen über die Peptidsequenz generiert werden. Diese Beobachtung deckt sich mit den Annahmen aus der mobile Protonentheorie zur Fragmentierung von Peptiden unter CID-Bedingungen (vgl. Kapitel 1.2.5.1). Von größter Bedeutung jedoch ist, dass bei dem pyrophosphorylierten Peptid das Signal, welches aus dem Neutralverlust von 178 Da resultiert, entweder den Basispeak des Fragmentspektrums darstellt oder zu den drei höchsten Signalen zählt.

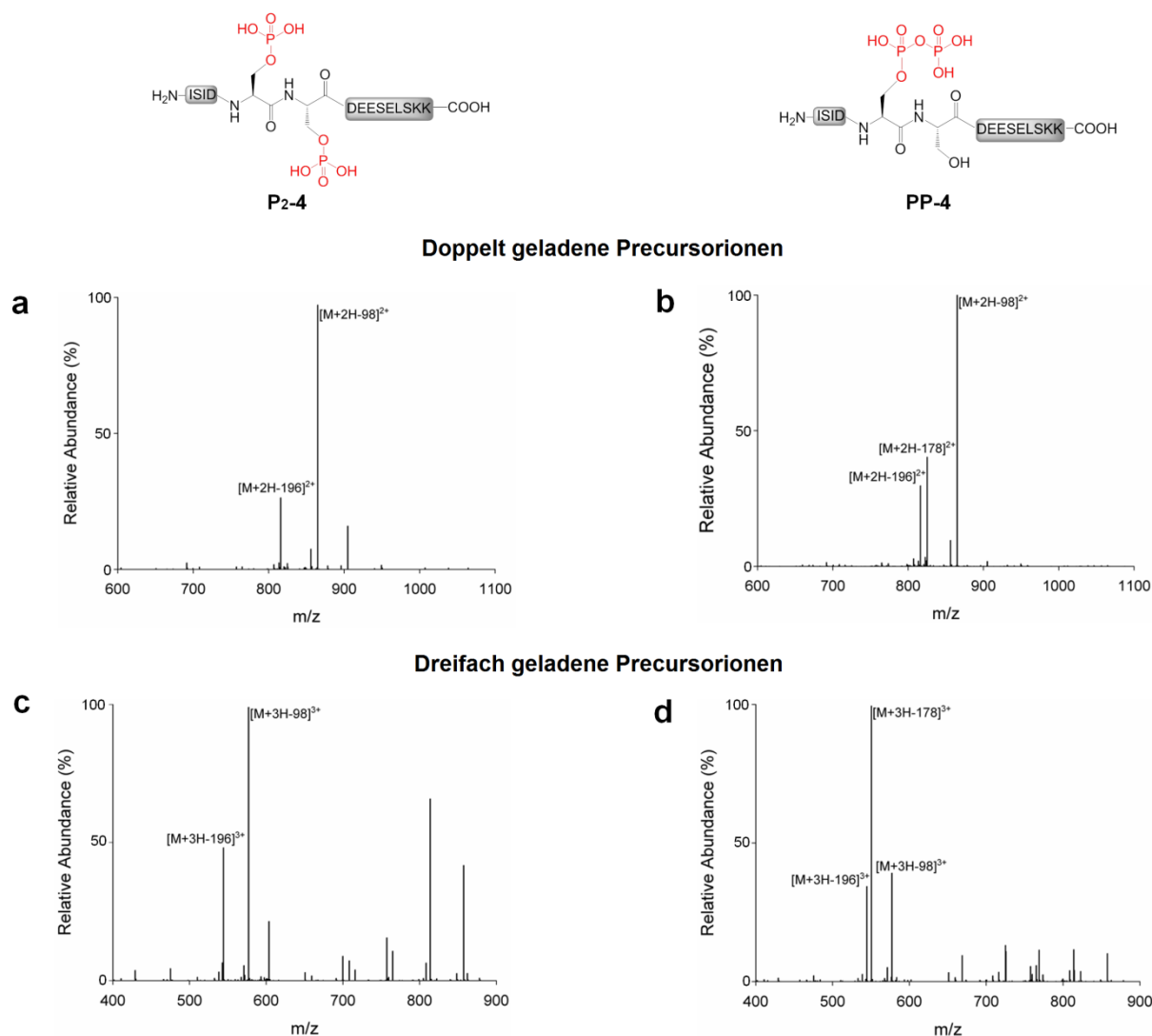


Abbildung 81: Einfluss des Ladungszustandes auf das Neutralverlustmuster von di- und pyrophosphorylierten Peptiden.

Die MS/MS Spektren (a) und (b) zeigen das Fragmentierungsverhalten doppelt geladener Precursorionen und die Spektren (c) und (d) das von dreifach geladenen Vorläuferionen. Die Gegenüberstellung zeigt, dass mit steigendem Ladungszustand der Anteil an Fragmentierungen entlang des Peptidrückgrates zunimmt. Außerdem wird das unterschiedliche Neutralverlustmuster der beiden isobaren Spezies deutlich.

Wie bereits in Kapitel 3.6 beschrieben, ist davon auszugehen, dass die Proteinpyrophosphorylierung vorwiegend in Sequenzabschnitten von Proteinen, bestehend aus zahlreichen Asparagin- und Glutaminsäureresten, zu erwarten ist. Außerdem können potentielle, pyrophosphorylierte Peptide einen hohen Anteil an Serin- und Threoninresten enthalten. Wird eine solche Aminosäuresequenz, welche diverse Hydroxyl- und Carboxylfunktionen enthält, mittels CID fragmentiert, so erhält man ausgeprägte Neutralverluste an Wasser (18 Da). In Kombination mit dem charakteristischen Neutralverlust von 178 Da resultiert daraus ein Fragmention, welches formal einem Neutralverlust von 196 Da entspricht. Diese kombinierten Neutralverluste könnten zur Folge haben, dass der diagnostische Neu-

tralverlust von 178 Da nicht mehr zuverlässig erkannt- und ein pyrophosphoryliertes Peptid fälschlicherweise als diphosphoryliertes Peptid identifiziert wird. Vor diesem Hintergrund wurde das über eine saure Aminosäuresequenz verfügende Peptid SSDSSppSSDSESESK (PP-3), welches zusätzlich diverse Serinreste enthält, synthetisiert und dessen Fragmentierungsverhalten untersucht. Das dazugehörige CID-MS/MS Spektrum ist in Abbildung 82a dargestellt. Dieses Fragmentspektrum wurde mit einer NCE von 35%, welches weit verbreiteten Fragmentierungsbedingungen entspricht, aufgezeichnet. Das Spektrum zeigt, dass die zusätzliche Eliminierung von Wasser zu einer signifikanten Reduktion des Neutralverlustes von 178 Da und zu einem erheblichen Anstieg des Neutralverlustes von 196 Da führte. Um die beträchtliche Eliminierung von Wasser zu reduzieren und die Signalintensität des diagnostischen Neutralverlustes von 178 Da zu erhöhen, wurde daher die Fragmentierungsenergie schrittweise verringert und somit der zusätzliche Neutralverlust von Wasser reduziert. Dies führte zu einem signifikanten Anstieg des diagnostischen Neutralverlustes von 178 Da (vgl. Abbildung 82).

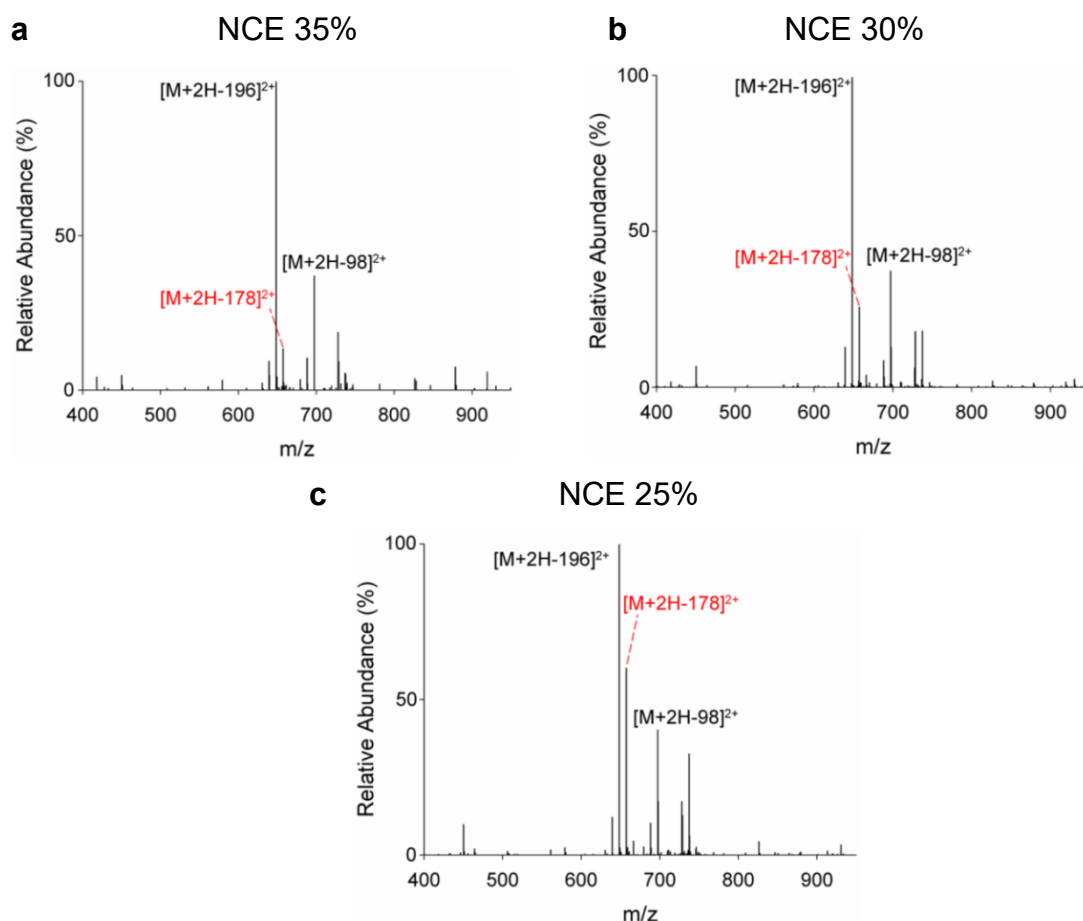


Abbildung 82: Einfluss der NCE auf die Intensität der Neutralverluste.

Die Veränderungen der relativen Intensitäten verschiedener Neutralverluste am Beispiel des Peptides SSDSSppSSDSESESK. Eine Reduktion der NCE von 35% in Abbildung a auf 25% in Abbildung c führt zu einer Erniedrigung des Signals, welches aus dem Neutralverlust von 196 Da resultiert und zu einer signifikanten Erhöhung des 178 Da Neutralverlustes. Das Signal, welches den diagnostischen Neutralverlust repräsentiert, ist rot hervorgehoben.

Ergebnisse und Diskussion

Tandemmassenspektrometrische Untersuchungen weiterer pyrophosphorylierter Peptide unter Verwendung der reduzierten NCE zeigten, dass der Neutralverlust 178 Da konsistent zu den drei intensivsten Signalen zählte und somit als ein bevorzugter Fragmentierungsweg auftritt. (vgl. Tabelle 4).

Tabelle 4: Neutralverlustmuster isobarer di- und pyrophosphorylierter Peptide.

Es sind die relativen Intensitäten und deren absolute Häufigkeit (N*) in Abhängigkeit vom Ladungszustand dargestellt.

Peptid	Peptidsequenz (Herkunft)	Precursorion	98 Da Neutralverlust		178 Da Neutralverlust		196 Da Neutralverlust	
		Ladungszustand (z)	rel. Int. [%]	N	rel. Int. [%]	N	rel. Int. [%]	N
P ₂ -1	VNEDSPSpSSK (Gcr1-Hefe)	2	100	1	-	-	40	3
P ₂ -2	SSEDpSpSEEDKA (Nopp140-Säugetier)	2	100	1	-	-	48	2
P ₂ -3	SSDSpSpSDESESK (AP3B1 - Säugetier)	2	28	4	-	-	40	2
P ₂ -4	ISIDpSpSDEESELKSK (Puf6-Hefe)	2	100	1	2	15	28	2
P ₂ -5	RSHHDDEEEpSpSEKK (Rpa34-Hefe)	2	100	1	8	4	46	2
P ₂ -6	SKVEDAEYEpSpSDDDEKLDK (Rrp5-Hefe)	2	100	1	6	7	74	2
P ₂ -2	SSEDpSpSEEDKA (Nopp140- Säugetier)	3	100	1	-	-	8	3
P ₂ -4	ISIDpSpSDEESELKSK (Puf6-Hefe)	3	100	1	-	-	44	4
P ₂ -5	RSHHDDEEEpSpSEKK (Rpa34-Hefe)	3	100	1	3	5	86	2
P ₂ -6	SKVEDAEYEpSpSDDDEKLDK (Rrp5-Hefe)	3	100	1	-	-	78	2
PP-1	VNEDSPSpSSSK (Gcr1-Hefe)	2	42	3	54	2	100	1
PP-2	SSEDppSSEEDKA (Nopp140- Säugetier)	2	34	3	100	1	48	2
PP-3	SSDSSpSDESESK (AP3B1 - Säugetier)	2	42	2	64	2	100	1
PP-4	ISIDppSDEESELKSK (Puf6-Hefe)	2	100	1	40	2	22	3
PP-5	RSHHDDEEEpSpSEKK (Rpa34-Hefe)	2	100	1	26	3	32	2
PP-6	SKVEDAEYEpSSDDEKLDK (Rrp5-Hefe)	2	100	1	23	3	25	2
PP-7	SHHDDEEEpSpSEKKK (Rpa34-Hefe)	2	100	1	20	2	10	3
PP-8	ISIDppTSDEESELKSK (Puf6;S→T-Hefe)	2	100	1	28	3	34	2
PP-2	SSEDppSSEEDKA (Nopp140- Säugetier)	3	100	1	60	2	15	4
PP-4	ISIDppSDEESELKSK (Puf6-Hefe)	3	70	2	100	1	40	3
PP-5	RSHHDDEEEpSpSEKK (Rpa34-Hefe)	3	100	1	40	2	28	3
PP-6	SKVEDAEYEpSSDDEKLDK (Rrp5-Hefe)	3	36	2	100	1	25	3
PP-7	SHHDDEEEpSpSEKKK (Rpa34-Hefe)	3	100	1	82	2	15	3
PP-8	ISIDppTSDEESELKSK (Puf6;S→T)	3	70	2	100	1	92	2

*N=1 entspricht dem Basepeak, N=2 dem zweitabundantesten Signale des Spektrums usw.

Ein weiterer Faktor, der Einfluss auf das Neutralverlustmuster während CID nimmt, ist der Aminosäurerest, welcher die Phosphorylierung trägt. Wenngleich die natürliche Häufigkeit von Serinphosphorylierungen die der Threoninphosphorylierungen deutlich übersteigt und somit auch die zu erwartenden Pyrophosphorylierungsstellen *in vivo* primär an Serinresten stattfinden sollten, so konnte eine Threoninpyrophosphorylierung vorab nicht ausgeschlossen werden. Vor diesem Hintergrund wurde das pyrophosphorylierte Peptid KIHDppTSDedMAINGLER synthetisiert und mittels CID-MS/MS fragmentiert. In der Tat wich das Fragmentierungsverhalten des threoninpyrophosphorylierten Peptides geringfügig ab. Zwar zeigte das Peptid das gleiche charakteristische Neutralverlustmuster eines pyrophosphorylierten Peptides. Gleichzeitig war jedoch ein höherer Grad an Fragmentierungen entlang des Peptidrückgrates zu verzeichnen (vgl. Abbildung 83).

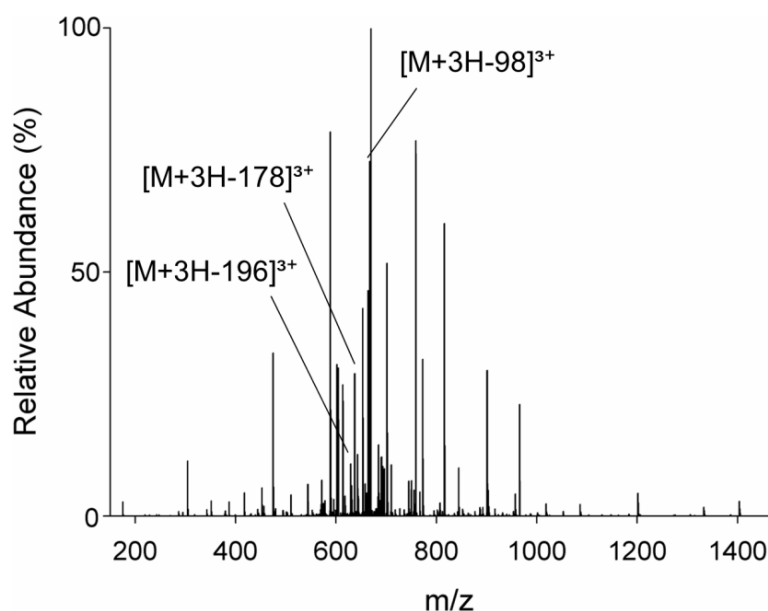


Abbildung 83: CID-MS/MS-Spektrum des pyrophosphorylierten Peptides KIHDppTSDedMAINGLER.

Um zu untersuchen, ob dieses Fragmentierungsverhalten einzig aus der Pyrophosphorylierungsstelle resultierte und um auszuschließen, dass es sich dabei um aminosäuresequenzspezifische Eigenschaften handelte, wurde das Fragmentierungsverhalten der Peptide ISIDppSSDEESELKK (PP-4) und ISIDppTSDDEESELKK (PP-8), welche sich ausschließlich in dem modifizierten Aminosäurerest unterscheiden, näher untersucht. Abbildung 84 ist zu entnehmen, dass das Peptid (PP-8), welches den Pyrophosphothreoninrest beinhaltet, das gleiche charakteristische Neutralverlustmuster von 98, 178 und 196 Da zeigte, wobei alle drei Signale zu den abundantesten zählten. Ferner fällt auf, dass der Anteil an Fragmentierungen des Peptidrückrates, wie bereits im Peptid KIHDppTSDedMAINGLER etwas höher im Vergleich zu seinem serinpyrophosphorylierten Counterpart war, ein Verhalten, welches sich mit Beobachtungen aus Studien zum Fragmentierungsverhalten von serin- und threonin-

phosphorylierten Peptiden deckt.³⁰⁶ Die sterische Hinderung der β -Methylgruppe in der Threoninseitenkette ist möglicherweise für diesen Effekt verantwortlich.³⁰⁴

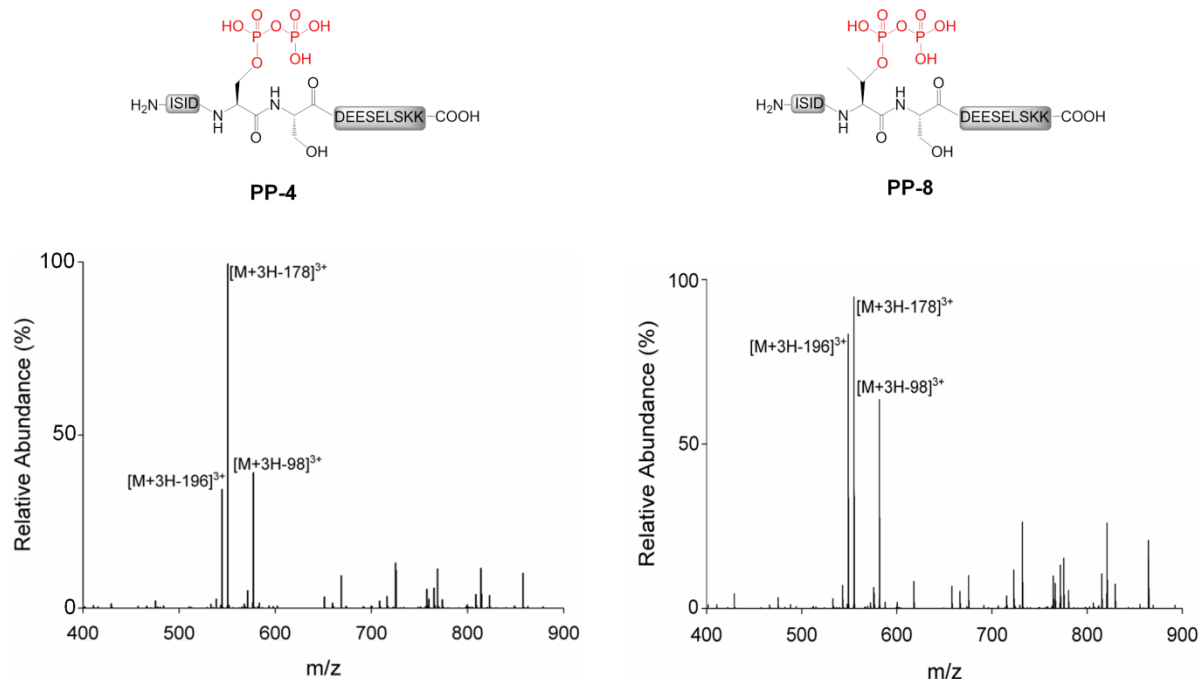


Abbildung 84: Vergleich des CID Fragmentierungsverhaltens der zwei pyrophosphorylierten Peptide (PP-4) und (PP-8).

Der Austausch des Aminosäurerestes, welche die Pyrophosphorylierung trägt, führt zu einer erhöhten Fragmentierung des Peptidrückgrates.

De Gnore *et al.* hatten mit Hilfe von niedrigauflösten Ionenfallen MS/MS-Spektren eines threoninphosphorylierten Peptides gezeigt, dass diese Modifikation neben dem Neutralverlust von 98 Da zusätzlich einen Neutralverlust von 80 Da generieren kann.³⁰⁸ Ein diphosphoryliertes Peptid, welches eine Serin- und eine Threoninphosphorylierung beinhaltet, könnte demzufolge einen Neutralverlust von 178 Da erzeugen und möglicherweise falsche Ergebnisse provozieren. Unter Berücksichtigung dessen wurde das diphosphorylierte Peptid KIHDPpTpSDEDMAINGLER einer kollisionsinduzierten Fragmentierung unterzogen. Hier ergab die Fragmentierung des dreifach protonierten Peptides (m/z 701,953) ein Signal, welches dem Neutralverlust von 178 Da hätte entsprechen können. Detaillierte Untersuchungen dieses Fragmentations mittels hochauflösender Massenspektrometrie zeigten jedoch, dass es sich dabei um ein Fragment des Peptidrückgrates handelte. Sowohl der Ladungszustand als auch die exakt gemessene Masse des Fragments waren nicht in Einklang mit einem Neutralverlust von 178 Da zu bringen (vgl. Abbildung 85).

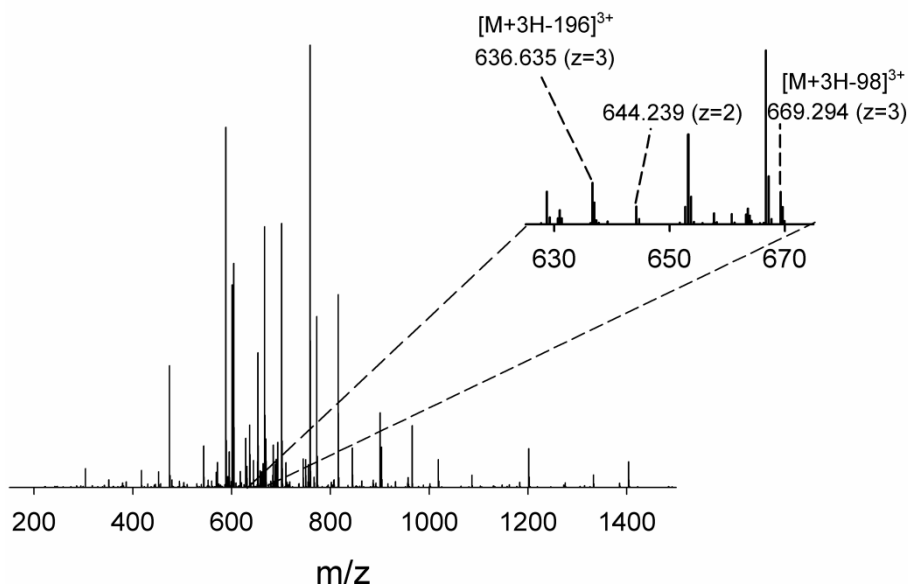


Abbildung 85: CID-MS/MS-Spektrum des dreifach geladenen Precursorions m/z 701,953 des Peptides KIHDpTpSDEdMAINGLER.

Der Ausschnitt aus dem Fragmentspektrum zeigt, dass sowohl der Ladungszustand ($z=2$) als auch das exakte Masse zu Ladungsverhältnis von m/z 644,239 nicht einem Neutralverlust von 178 Da entspricht.

Außerdem war die relative Abundanz des gemessenen Signals vernachlässigbar klein im Vergleich zu den Signalen, welche bei pyrophosphorylierten Peptiden detektiert wurden.

Diese Beobachtung untermauert aufs Neue, dass der charakteristische Neutralverlust von 178 Da als ein wichtiges Kriterium zur Unterscheidung isobarer di- und pyrophosphorylierter Peptide fungieren kann und dass das Neutralverlustmuster ein erster, wichtiger Indikator für die Anwesenheit eines pyrophosphorylierten Peptides ist. Dennoch war eine zweifelsfreie Lokalisierung der Modifizierungsstelle aufgrund der erheblichen Verluste der Pyrophosphorylierung mit Hilfe von kollisionsbasierten Fragmentierungstechniken unmöglich.

3.6.4 Ionenmobilität pyro- und diphosphorylierter Peptide

In Kapitel 3.6.1 (Abbildung 78) wurde darauf eingegangen, dass di- und pyrophosphorylierte Peptide ein ähnliches RP-chromatographisches Verhalten aufweisen. Fragmentspektren isobarer, coeluerender Peptide weisen Fragmente auf, welche beiden Spezies zugeordnet werden können, in dessen Folge eine zweifelsfreie Unterscheidung erschwert oder unmöglich ist. Die Ionenmobilität bietet eine komplementäre Trenndimension zur RP-Chromatographie. Unter Berücksichtigung dessen wurden Ionenmobilitätsstudien von di- und pyrophosphorylierten Peptiden durchgeführt. Ohne eine vorangegangene

chromatographische Trennung wurden Mischungen der isobaren Peptide mit einem TIMS-TOF Instrument untersucht.

Für die Ionenmobilitätstrennung wurden maximal 100 ms verwandt. Die Elution der Precursorionen aus der Mobilitätszelle, deren Isolierung und Fragmentierung erfolgte binnen weniger Millisekunden. Abschließend wurden die Fragmente innerhalb von 110 μ s detektiert. Dieser kurze Messzyklus ermöglichte es, mehrere extrahierte Ionenmobilogramme verschiedener Fragmente sehr schnell hintereinander aufzuzeichnen. Exemplarisch dafür sind in Abbildung 86 die Ionenmobilogramme der Precursorionen (blau), der unspezifischen Neutralverluste von 98 und 196 Da (rot) und des Neutralverlustes von 178 Da (grün) der dreifach protonierten Peptide SKVEDAEYEppSSDDEDEKLDK und SKVEDAEYEppSpSDDEDEKLDK bei verschiedenen Auflösungen abgebildet (vgl. Abbildung 86).

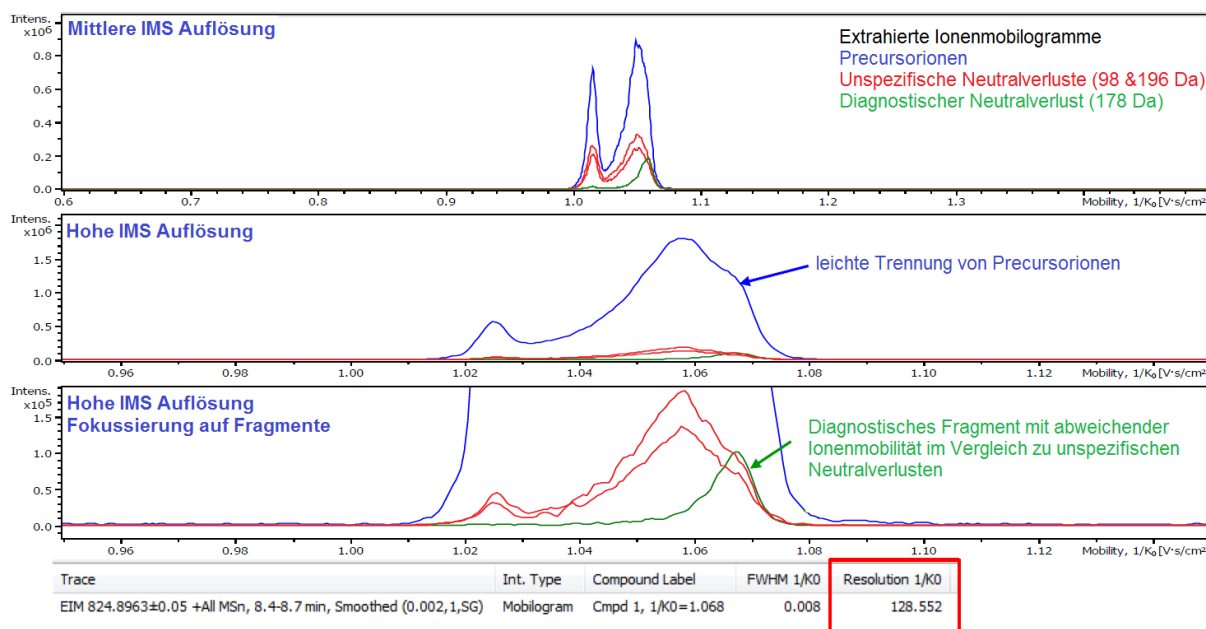


Abbildung 86: Ionenmobilitätsspuren der Peptide SKVEDAEYEppSSDDEDEKLDK und SKVEDAEYEppSpSDDEDEKLDK.

Die extrahierten Ionenmobilogramme der Precursorionen sind blau, der Neutralverluste von 98 & 196 Da rot und des Neutralverlustes von 178 Da grün dargestellt. Eine Erhöhung der Auflösung führt zu einer geringfügigen Trennung der Precursorionen (mittlere Abbildung). Anhand des extrahierten Ionenmobilogramms des diagnostischen Neutralverlustes ist eine Unterscheidung beider Spezies möglich (untere Abbildung).

Die Ionenmobilitätsprofile der Precursorionen und der Fragmentationen zeigen drei verschiedene Peakmaxima. Zwei dieser Maxima stammen von den Precursorionen und dem unspezifischen Neutralverlusten. Eine Erhöhung der Auflösung führt zur Ausbildung einer Schulter bei den Ionenmobilogrammen des Precursorions und der Neutralverluste von 98 und 196 Da, sodass von einer beginnenden Trennung der isobaren Precursorionen ausgegangen werden kann. Diese Beobachtung deckt sich mit

dem Ionenmobilogramm des pyrophosphospezifischen Neutralverlustes. Daraus lässt sich ableiten, dass das diphosphorylierte Peptid zwei Protomere aufweist, wohingegen das pyrophosphorylierte Peptid nur ein Protomer bildet. Die Messung der reinen Standardpeptide stützte diese These (siehe Anhang). Die gewünschte Basislinientrennung der Precursorionen wurde in dem gezeigten und weiteren Beispielen isobarer Peptide zwar nicht erreicht, dennoch war eine Unterscheidung anhand der Ionenmobilogramme des diagnostischen Neutralverlustes von 178 Da möglich, sodass die IM-MS ein nützliches Werkzeug bei der Verifizierung einer Peptidpyrophosphorylierung darstellt. Die größte Herausforderung, die eindeutige Lokalisierung der Pyrophosphorylierungsstelle, lässt sich jedoch nicht mit Hilfe der IM-MS realisieren, sodass verschiedene ETD-basierte Tandem-MS-Experimente erprobt wurden.

3.6.5 Zweifelsfreie Lokalisierung von Pyrophosphorylierungsstellen mittels EThcD

Fragmentationsserien isobarer pyrophosphorylierter und diphosphorylierter Peptide (mit zwei benachbarten, phosphorylierten Aminosäureseitenketten) unterscheiden sich jeweils nur in einem *N*-terminalen und einem *C*-terminalen Fragmentation. Für eine zweifelsfreie Charakterisierung der Pyrophosphorylierungsstelle sind daher eine lückenlose Sequenzabdeckung oder zumindest Fragmentationen, welche die Modifizierungsstelle abdecken, unabdingbar. Bereits bei der Fragmentierung doppelt geladener Precursor wurde angedeutet, dass es möglich ist mit EThcD pyrophosphorylierte Peptide zu identifizieren (vgl. Kapitel 3.2.2). An dieser Stelle soll anhand eines konkreten Beispiels noch einmal das Potential elektronentransfer-basierter Techniken gezeigt werden. Das Hauptaugenmerk lag dabei auf der Stabilität der Pyrophosphorylierung unter den verschiedenen Fragmentierungsbedingungen und dem Grad der Sequenzabdeckung. Abbildung 87 ist zu entnehmen, dass unter ETciD signifikante Mengen des Precursorions unfragmentiert bleiben und das Spektrum zusätzlich von dem ladungsreduzierten Precursorion dominiert ist.

Die relative Abundanz der Fragmentationen ist gering und in der Regel unter 5%. Im Gegensatz dazu weist das EThcD-Spektrum eine höhere Fragmentierungseffizienz auf. Mit dieser Technik lässt sich eine vollständige Fragmentierung des Precursorions realisieren. In Folge dessen steigt auch die relative Abundanz der Fragmentationen erheblich an und erreicht Intensitäten von 10 bis 40%. Es jedoch nicht nur ein quantitativer Anstieg der Fragmentationen zu verzeichnen, auch die Anzahl der Fragmente nimmt signifikant über den gesamten *m/z*-Bereich des Spektrums zu. Insbesondere kleine Fragmente, welche zuvor abwesend waren, werden vermehrt durch die zusätzliche HCD-Aktivierung erzeugt. All dies erfolgt unter Erhalt der labilen Modifikation, wie die diagnostischen Fragmentationen *c*₅, *y*₁₁ und *z*₁₁ dokumentieren. Da für beide Techniken keine Migrationen einzelner Phosphatreste oder der gesamten Pyrophosphorylierung detektiert wurden, ermöglichten sie die zweifelsfreie Bestimmung der Modifi-

zierungsstelle an Position Ser-5 in PP-4. Aufgrund der besseren Sequenzabdeckung des Peptides ist jedoch die EThcD- der ETciD-Fragmentierung vorzuziehen.

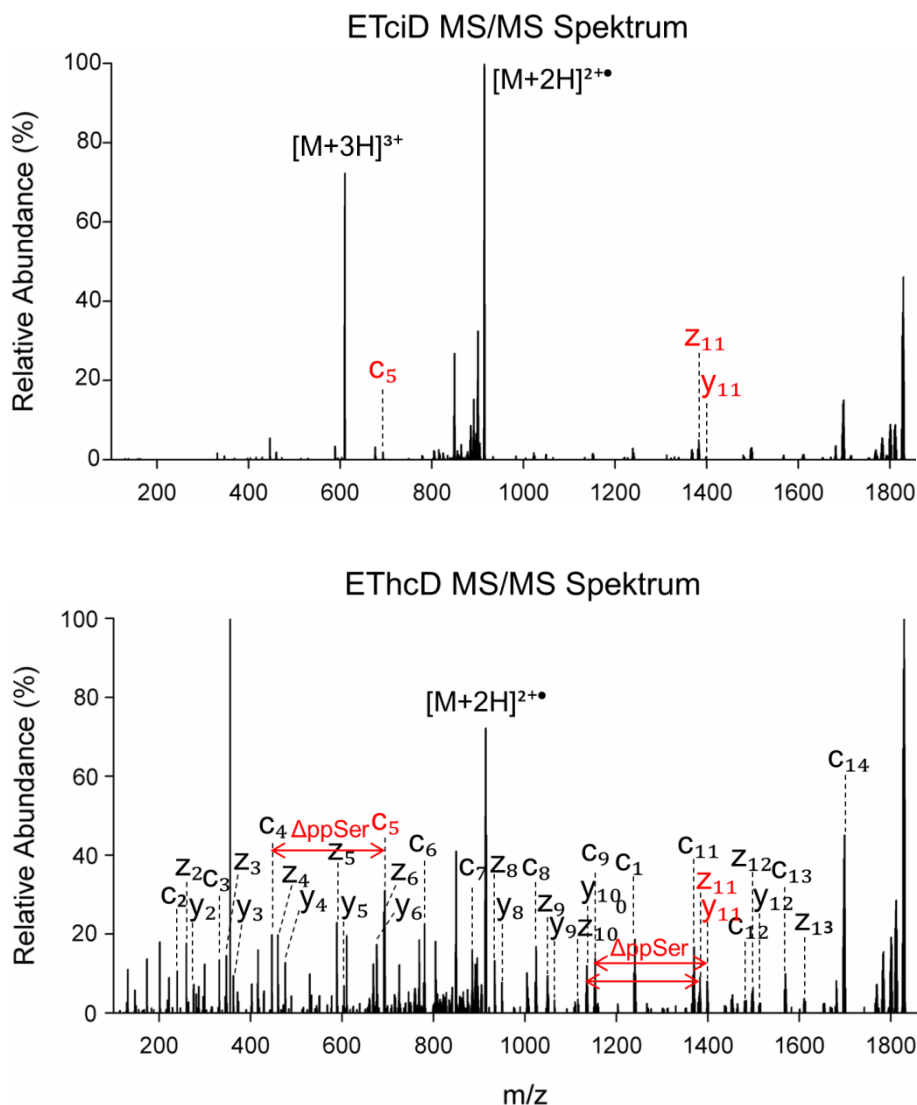


Abbildung 87: Vergleich zwischen ETciD- und EThcD-MS/MS.

Beide Fragmentierungstechniken ermöglichen eine Fragmentierung des Peptides PP-4 unter Erhalt der Pyrophosphorylierung. Das EThcD-Fragmentspektrum weist jedoch eine bessere Fragmentierungseffizienz auf. Es ist gekennzeichnet durch eine lückenlose Sequenzabdeckung ohne signifikanten Neutralverlust und enthält die diagnostischen Fragmentationen c_5 , z_{11} und y_{11} , welche eine zweifelsfreie Lokalisierung der Pyrophosphorylierungsstelle an Position Ser-5 des Peptides erlauben.

Die zweifelsfreie Identifizierung der Pyrophosphorylierung implizierte, dass es möglich ist beide isobaren Peptide zu unterscheiden. Dennoch galt es, dies anhand eines diphosphorylierten Peptides zu dokumentieren. Unter Berücksichtigung dessen wurde ein EThcD-Spektrum des diphosphorylierten Peptides P₂-4 aufgezeichnet. In Abbildung 88 sind die für die Unterscheidung relevanten Ausschnitte

der ETHCD-Spektren gegenübergestellt. Beide Peptide lassen sich ausschließlich durch Spaltungen des Peptidrückrates zwischen den Aminosäureresten Ser-5 und Ser-6 unterscheiden. Dementsprechend müssen sich das *N*-terminale Fragmention c_5 und das *C*-terminale Fragmention z_{10} voneinander abheben. Tatsächlich zeigt der Vergleich, dass in dem oben abgebildeten Fragmentenspektrum des pyrophosphorylierten Peptides das Fragmention c_5 etwa 80 Da größer ist als das des unten abgebildeten diphosphorylierten Peptides. Dies entspricht der Massendifferenz zwischen dem Phosphat- und dem Pyrophosphatrest. Die relative Abundanz des Fragmentions c_5 von ca. 20% unterstreicht die hohe Fragmentierungseffizienz von ETHCD und zeigt, dass die Pyrophosphorylierung stabil ist unter diesen Fragmentierungsbedingungen. Desweiteren kann ein mögliches Megrieren eines Phosphatrestes zu dem benachbarten Serinrest ausgeschlossen werden. Auf der anderen Seite kann auch eine Migration eines der Phosphatreste unter Formung eines Pyrophosphatrestes während des Fragmentierungsprozesses ausgeschlossen werden. Vergleicht man die entsprechenden z_{10} Fragmentionen, so zeigt sich, dass wiederum ein Unterschied von 80 Da auftritt. Da nur das diphosphorylierte Peptid eine Modifikation trägt, hat das dazugehörige Fragmention auch das größere m/z -Verhältnis.

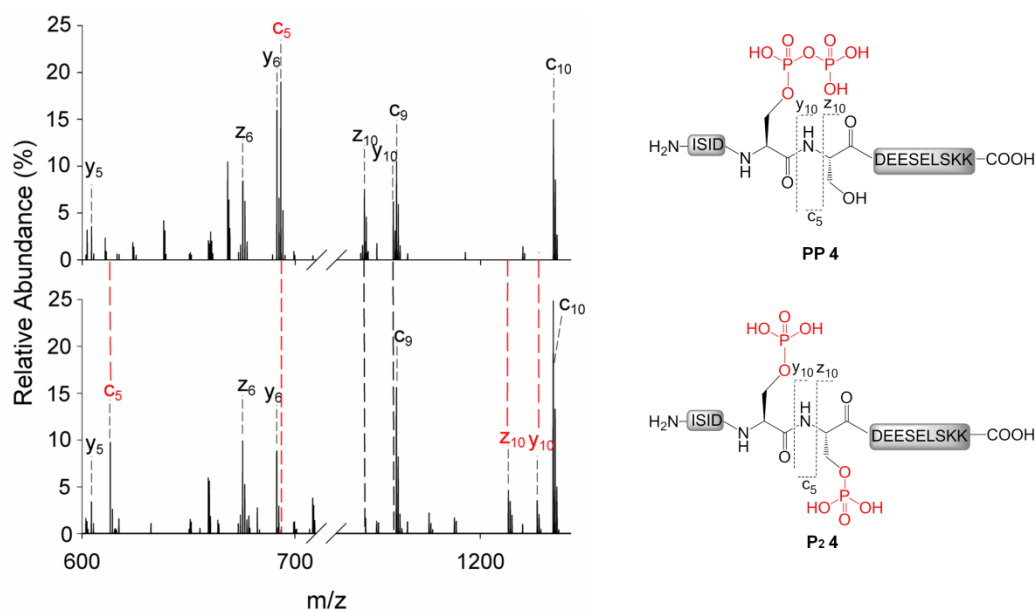


Abbildung 88: Vergleich von ETHCD-Spektren der isobaren Peptide PP-4 und P2-4.

Die Ausschnitte zeigen, dass sowohl Pyrophosphorylierungen als auch Phosphorylierungen stabil sind unter diesen Fragmentierungsbedingungen und keine Migrationen der Modifikationen auftreten. Somit ist eine eindeutige Unterscheidung der verschiedenen Spezies anhand der unterschiedlichen Masse-zu-Ladungsverhältnisse der Fragmentionen c_5 , z_{11} und y_{11} möglich.

Durch die zusätzliche HCD-Aktivierung nach dem ETD Prozess treten oftmals während EThcD b- und y-Fragmentationen auf (vgl. Kapitel 1.2.5.4). Interessanterweise können auch diese Fragmente, entgegen den Ergebnissen aus den HCD-Fragmentierungsexperimenten, labile Modifikationen tragen und zur Charakterisierung beitragen. Exemplarisch dafür sei das Fragmentation y_{10} des doppelt phosphorylierten Peptides erwähnt, welches eindeutig eine Phosphorylierung trägt. Die Fragmentationen y_{10} und z_{10} bilden zusammen ein sogenanntes „goldenes Doublet“ und ermöglichen eine zweifelsfreie Bestimmung und Validierung von Phosphorylierungsstellen. Zusammen mit dem Fragmentation c_5 lassen sich somit die beiden isobaren Spezies gleicher Aminosäuresequenz anhand von drei Fragmentationen mit Hilfe der EThcD-Fragmentierung charakterisieren.

3.6.6 Neutralverlust getriggerte EThcD zur Identifizierung von Pyrophosphopeptiden

Die vorangegangenen Kapitel haben gezeigt, dass EThcD die Methode der Wahl zur Identifizierung von pyrophosphorylierten Peptiden ist. Die Technik hat jedoch zwei wesentliche Nachteile im Vergleich zu kollisionsbasierten Fragmentierungstechniken: Sie ist erheblich langsamer und verfügt über eine geringere Empfindlichkeit (vgl. Tabelle 5).

Tabelle 5: Gegenüberstellung wesentlicher Fragmentierungsparameter von CID und EThcD

Parameter	CID (Ionenfalle)	EThcD Orbitrap; (R=15.000)
AGC-Targetwert	5e3	5e4
Durchschnittliche Injektionszeit	ca. 30-35 ms	ca. 300-350 ms
Maximale Injektionszeit	50 ms	500 ms
Reaktionszeit für Fragmentierung	10 ms	Doppelt geladene Precursorionen ca. 100 ms Dreifach geladene Precursorionen ca. 50 ms Vierfach geladene Precursorionen ca. 25 ms + 5-15 ms zusätzliche HCD Aktivierung
Parallelität mit MS ¹ -Aufzeichnung	Gegeben	Nicht gegeben
Messzeit für Detektion incl. Ionentransfer		23,5 ms
Durchschnittliche Anzahl MS/MS pro Sekunde	11-14	2-3
Maximale Anzahl MS/MS pro Sekunde	ca. 20	4-5

Während für ein CID-Spektrum, erfasst in der Ionenfalle, ein AGC-Targetwert von 5×10^3 ausreichen um ein Peptid identifizieren zu können, müssen für ein aussagekräftiges EThcD-Spektrum ca. zehnmal

mehr Ionen gesammelt werden. Dementsprechend höhere Injektionszeiten werden benötigt. Außerdem ist die Reaktionszeit des ETD-Prozesses länger als bei CID. Da EThcD-Spektren aufgrund ihrer inhärenten Komplexität in der Orbitrapzelle gemessen werden, wird zusätzliche Zeit für die Detektion in Anspruch genommen. Des Weiteren sind die parallele Erfassung eines hochaufgelösten MS¹ und die Fragmentierung von Precursorionen in einem DDA-Experiment aufgehoben. In der Summe führt dies dazu, dass sich mit EThcD durchschnittlich drei bis maximal fünf Precursorionen pro Sekunde erfassen lassen. Bei einer komplexen Probe sind diese Zykluszeiten bereits zu langsam. Wenn man berücksichtigt, dass in einer datenabhängigen Top N-Methode zuerst die hochabundanten Precursorionen fragmentiert werden, führt dies dazu, dass niedrig abundante und womöglich relevante Precursorionen nicht erfasst werden. Im Gegensatz dazu lassen sich mittels CID im gleichen Zeitraum bis zu 20 Precursorionen fragmentieren und in der Ionenfalle detektieren.

Ein Resümee der gewonnenen Erkenntnisse lässt nur einen Schluss zu: Die EThcD Fragmentierung ist für einen globalen phosphoproteomischen Ansatz nur bedingt geeignet und muss idealerweise selektiv nach Bedarf eingesetzt werden. Als nützlicher Indikator kann hierbei das charakteristische Neutralverlustmuster pyrophosphorylierter Peptide unter kollisionsinduzierter Dissoziation mit reduzierter CE fungieren. In einem sogenannten Neutralverlust getriggerten EThcD MS/MS-Ansatz (DDNL-EThcD) werden demzufolge zu Beginn möglichst viele Precursorionen mit hoher Geschwindigkeit und Empfindlichkeit mittels CID fragmentiert. Sobald im sogenannten Filterscan das charakteristische Neutralverlustmuster pyrophosphorylierter Peptide auftritt, wird ein zusätzliches EThcD-MS² von dem gleichen Precursorion erfasst. Das getriggerte EThcD-Spektrum wird direkt im Anschluss an das CID-Spektrum oder nach Einschub eines zusätzlichen MS¹ generiert, sodass nur der Bruchteil einer Sekunde zwischen der Erkennung des Neutralverlustmusters und dem eigentlichen EThcD-Scan liegt. Somit wird sichergestellt, dass das Precursorion von Interesse fragmentiert wird.

Für die Erfassung des EThcD-Spektrum wechselt das System in einen empfindlichen und selektiven targeted SIM-Modus. Der scannende Quadrupol isoliert dabei zu einem frühen Punkt der Ionenoptik, innerhalb eines schmalen m/z -Fensters von 1,2-1,4 Da ausschließlich das gesuchte Precursorion, welches im Anschluss der komplexen EThcD-Fragmentierung unterzogen wird.

Ähnliche Ansätze wurden bereits auf dem Gebiet der Phosphoproteomic eingesetzt. Diese beschränkten sich jedoch auf den Neutralverlust von 98 Da. Um die Anzahl an falschpositiv getriggerten ETD-Spektren zu minimieren, erforderten diese Ansätze strikte Triggerkriterien (Signalintensität und Top N), in dessen Folge es zu einer signifikanten Anzahl an verpassten Phosphopeptidprecursorionen kam.^{221, 233} Im Gegensatz dazu ermöglicht das charakteristische Neutralverlustmuster von pyrophosphorylierten Peptiden, sich auf mehrere Neutralverluste (98 & 178 Da) zu konzentrieren. Dies erhöht zum einen die Spezifität des Filterscans und ermöglicht zum anderen weniger restriktive Triggerkriterien. Daraus resultiert eine geringe Anzahl an falschpositiv getriggerten EThcD-Spektren und gleichzeitig wird das Risiko an nicht erkannten pyrophosphorylierten Peptiden minimiert. Darüber hinaus erlaubt der DDNL-EThcD-Ansatz die Verwendung kurzer dynamischer Ausschlusszeiten,

sodass beide isobaren Spezies innerhalb einer Probe erfasst werden können. Aufgrund der erheblich kürzeren Zykluszeit des CID-Scans erhöht sich die Anzahl an erzeugten MS/MS-Experimenten erheblich gegenüber einem gewöhnlichen, datenabhängigen EThcD-Ansatz. Des Weiteren eröffnet dies die Möglichkeit, lange Injektionszeiten für den EThcD-Scan einzusetzen, ein entscheidender Aspekt, um die Empfindlichkeit des EThcD-Scans zu erhöhen. Da man sich bei der Auswertung auf die getriggerten EThcD-Spektren konzentriert, reduziert sich auch der zeitliche Aufwand für die bioinformatische Analyse erheblich.

Basierend auf den Erkenntnissen zum Fragmentierungsverhalten pyrophosphorylierter Peptide lässt sich ein datenabhängiger Entscheidungsbaum entwickeln (vgl. Abbildung 89).

Zur Demonstration der Leistungsfähigkeit des neutralverlustgetriggerten EThcD-Ansatzes wurde ein Experiment durchgeführt, bei dem ca. 100 fmol des Peptides ISIDppSSDEESELKK (PP-4) in 500 nmol eines standardisierten HeLa Proteinverdaus zugegeben wurden. Die Probe wurde mit Hilfe des nLC-ESI-DDNL-EThcD-Ansatzes analysiert (vgl. Abbildung 90). Ein CID-MS/MS Spektrum, aufgezeichnet bei einer Retentionszeit von 38,8 min, wies das charakteristische Neutralverlustmuster von 98, 178 und 196 Da auf. Die Neutralverluste zählten zu den abundantesten Signalen, wiesen eine relative Intensität größer 15% auf und erfüllten die Triggerkriterien. Das im Anschluss getriggerte EThcD-Spektrum wies eine lückenlose Sequenzabdeckung auf, sodass die Pyrophosphorylierung anhand der Fragmentionen y_{11} und z_{11} zweifelsfrei an Position S5 im Peptid identifiziert werden konnte. Hervorzuheben ist, dass es sich bei dem identifizierten Precursorion um ein zweifach positiv geladenes Ion handelte. Eine Sequenzierung des Peptides und die eindeutige Lokalisierung der Pyrophosphorylierungsstelle wären demzufolge sowohl mit HCD als auch mit ETD nicht möglich gewesen.

Ein weiteres Aliquot der Probe wurde verwandt, um es mit einem standardmäßigen EThcD-Ansatz zu analysieren. Das Precursorion wurde dabei zwar im MS¹-Scan detektiert, die lange Zykluszeit der EThcD-Fragmentierung verhinderte jedoch, dass dieses auch fragmentiert wurde. Ein weiterer Beleg dafür, dass die notwendige analytische Tiefe nur mit Hilfe der Schnelligkeit und Empfindlichkeit des DDNL-EThcD-Ansatzes erreicht werden kann.

Darüber hinaus gilt es zu beachten, dass es sich bei der verwandten Probenmatrix in dem Modellexperiment um ein komplettes Vollproteom ohne jegliche Anreicherung handelte. Bei der Identifizierung potentieller, endogener Pyrophosphorylierungsstellen ist davon auszugehen, dass zuvor eine phosphopeptidspezifische Anreicherung erfolgt, sodass sowohl die Komplexität als auch der dynamische Bereich der Probe geringer sein sollten als in dem Modellexperiment. Außerdem ist davon auszugehen, dass das chromatographische Verhalten und die Ionisierungsfähigkeit der Phosphopeptide vergleichbar mit den pyrophosphorylierten Peptiden sein sollten. Trotz der größeren Herausforderungen, während des Experiments mit dem zugesetzten Peptid, gelang die sichere Identifizierung des pyrophosphorylierten Peptides. In Kombination mit einem pyrophosphospezifischen Anreicherungsverfahren sind mit dem DDNL-EThcD-Ansatz die Grundlagen für die Identifizierung der ersten endogenen Pyrophosphorylierungsstellen gegeben.

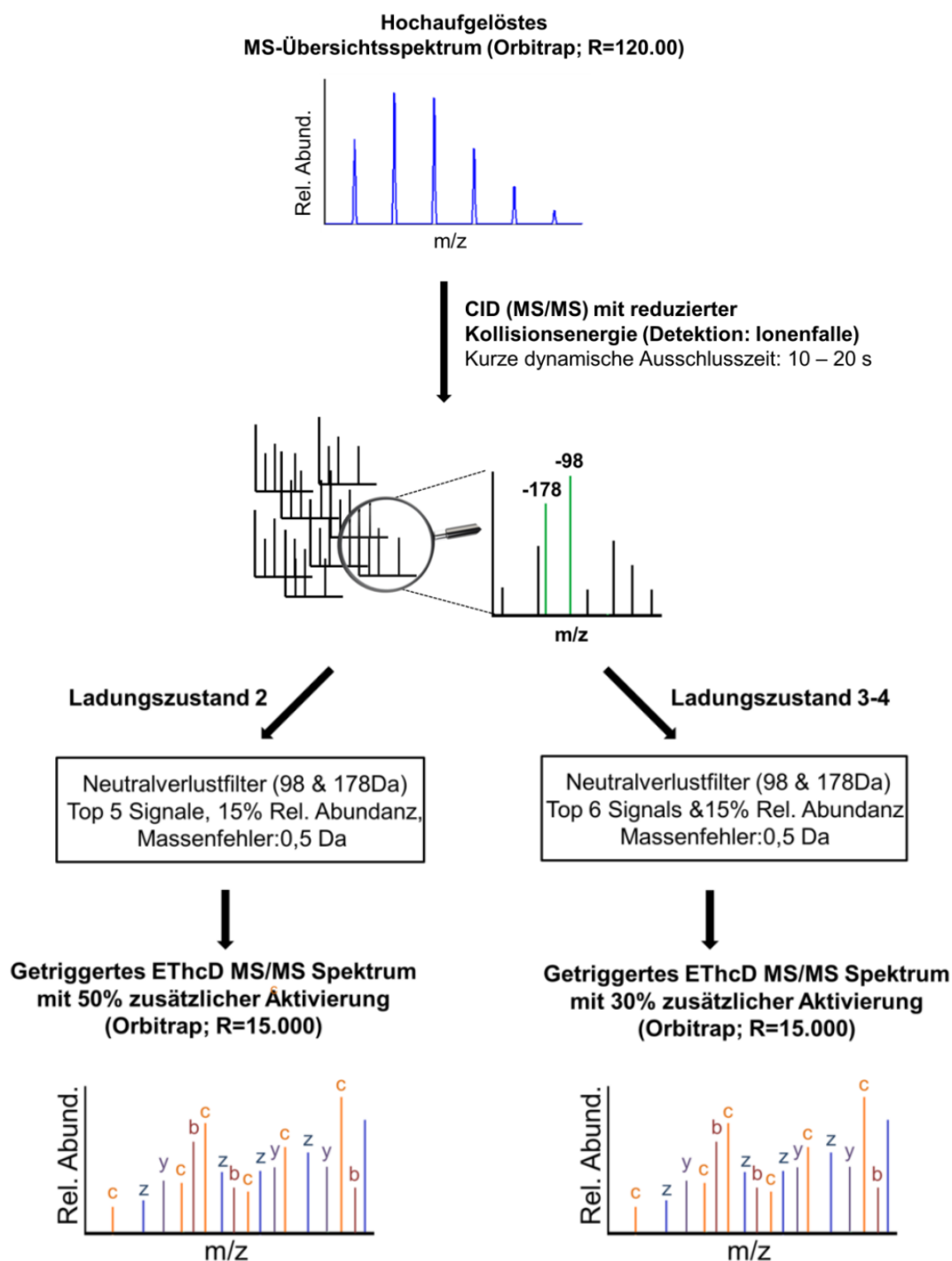


Abbildung 89: Schema des datenabhängigen neutralverlustgetriggerten ETHcD MS/MS-Ansatzes (DDNL-ETHcD).³⁰⁹

Nach einem hochaufgelösten MS¹ werden in einer datenabhängigen Aufzeichnung mit hoher Geschwindigkeit möglichst viele Precursorionen mittels CID und einer reduzierten Kollisionsenergie erfasst (CID-Filterscan). Sobald das charakteristische Neutralverlustmuster eines pyrophosphorylierten Peptides mit den Neutralverlusten 98 & 178 Da auftritt, wird ein zusätzliches ETHCD-Spektrum des gleichen Precursorions aufgezeichnet. Die Filterkriterien und die Fragmentierungsbedingungen des ETHcD MS/MS-Scans unterscheiden sich dabei nach dem Ladungszustand des Precursorions.

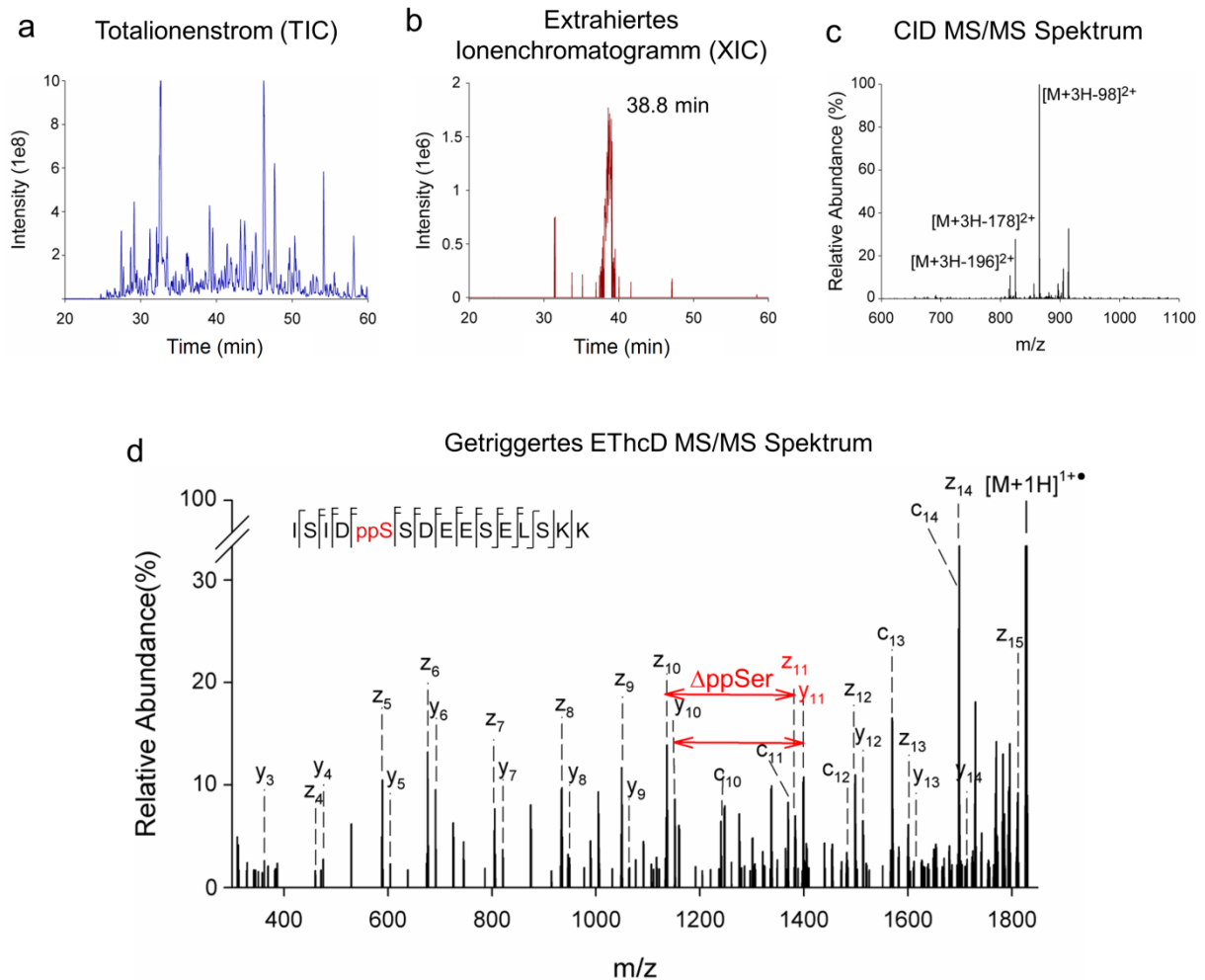


Abbildung 90: Identifizierung des Peptides (PP-4) in einem Spike-inexperiment mit Hilfe des DDNL-ETHcD-Ansatzes.

(a) Totalionenstrom (TIC) des Hela Proteinverdaus. (b) Extrahiertes Ionenchromatogramm (XIC) des doppelt geladenen Precursorions m/z 913,872 des zugesetzten Peptides PP-4. Das pyrophosphorylierte Peptid, dessen Aminosäuresequenz vorwiegend aus sauren Aminosäureresten besteht, weist eine ausreichende chromatographische Retention und eine relativ große Peakbreite auf. (c) CID MS/MS-Spektrum mit den Neutralverlusten 98, 178 und 196 Da erfasst bei einer Retentionszeit von 38,8 min. Die Neutralverluste 98 und 178 Da zählen zu den drei höchsten Signalen und übersteigen eine relative Abundanz von 20%. (d) Getriggertes ETHcD-Spektrum des pyrophosphorylierten Peptides ISIDppSSDEESELKK. Das Spektrum weist trotz des niedrigen Ladungszustandes eine lückenlose Sequenzabdeckung ohne Verlust der labilen Modifikation auf. Die diagnostischen Fragmentionen, welche für die Positionsbestimmung herangezogen werden, sind rot hervorgehoben.

3.6.7 Identifizierung endogener Proteinpyrophosphorylierungen in *S.cerevisiae*

Der DDNL-ETHcD-Ansatz hat während des o.g. Experiments seine hohe Leistungsfähigkeit unter Beweis gestellt. Dies galt es, in Verbindung mit einem Pyrophosphopeptid spezifischen Anreicherungsverfahren, auf ein Zelllysats von *S.cerevisiae* zu übertragen.¹⁴³ Dazu wurden im Labor von Prof. Fiedler Hefezellen lysiert, die Proteine mit Trypsin verdaut und die entstandenen Peptide auf einen festphasen gebundenen, dinuklearen Zink(II)komplex gegeben (vgl. Kapitel 1.2.3). Nach einem Waschschrift wurden die immobilisierten Peptide mit anorganischem Pyrophosphat eluiert und mit der DDNL-ETHcD-Methode analysiert (vgl. Abbildung 91).

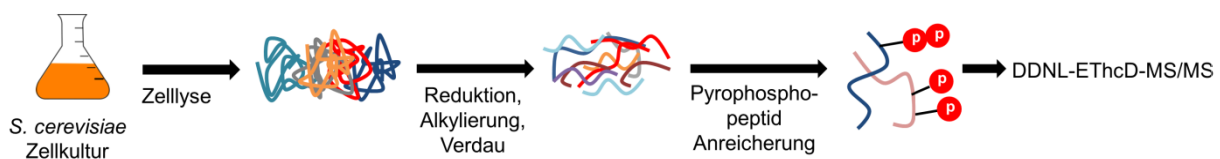


Abbildung 91: Workflow zur Identifizierung endogener Proteinpyrophosphorylierungen in *S.cerevisiae*.

Die Auswertung der Messdaten ergab, dass der überwiegende Anteil an angereicherten Peptiden mehrfach phosphoryliert war. Es wurde jedoch auch eine geringe Anzahl an ETHCD-Experimenten getriggert. Darunter triggerte das CID-MS/MS-Spektrum eines dreifach geladenen Precursorions mit m/z 830,982. In Abbildung 92a ist das dazugehörige extrahierte Ionenchromatogramm abgebildet. Das Chromatogramm zeigt einen Doppelppeak, wobei das CID-Spektrum des ersten Peaks das Neutralverlustmuster eines doppelt phosphorylierten Peptides aufweist. Wohingegen das CID-Spektrum des zweiten Peaks zusätzlich den diagnostischen Neutralverlust von 178 Da illustriert. Auch das chromatographische Verhalten beider Spezies ist charakteristisch für ein Paar von isobaren di- und pyrophosphorylierten Peptiden. Beide Peaks eluierten mit relativ großen Peakhalbwertsbreiten, unterschieden sich in ihren Retentionszeiten nur um ca. 30 Sekunden und waren nicht Basislinien getrennt, wobei die diphosphorylierte Spezies als erstes detektiert wurde.

Das getriggerte ETHCD-Spektrum wies eine lückenlose Sequenzabdeckung ohne Verlust der labilen Modifikation auf und erlaubte die zweifelfreie Lokalisierung der Pyrophosphorylierung. Das identifizierte Peptid ist Bestandteil des rRNA-Bindungsproteins Rrp5 und erlaubte die Lokalisierung der ersten endogenen Proteinpyrophosphorylierung an Position Ser-206 im Protein. Rrp5 wurde bislang noch nicht in Verbindung mit der Biologie der Inositolpyrophosphate gebracht, die Position Ser-206 und Ser-207 wurden jedoch bereits als doppelt phosphoryliert annotiert.³⁰²

Um die Pyrophosphorylierungsstelle zusätzlich zu verifizieren wurde das Peptid synthetisiert, ein ETHCD-Spektrum aufgezeichnet und dem Spektrum des endogenen Peptides gegenübergestellt (vgl. Abbildung 92).

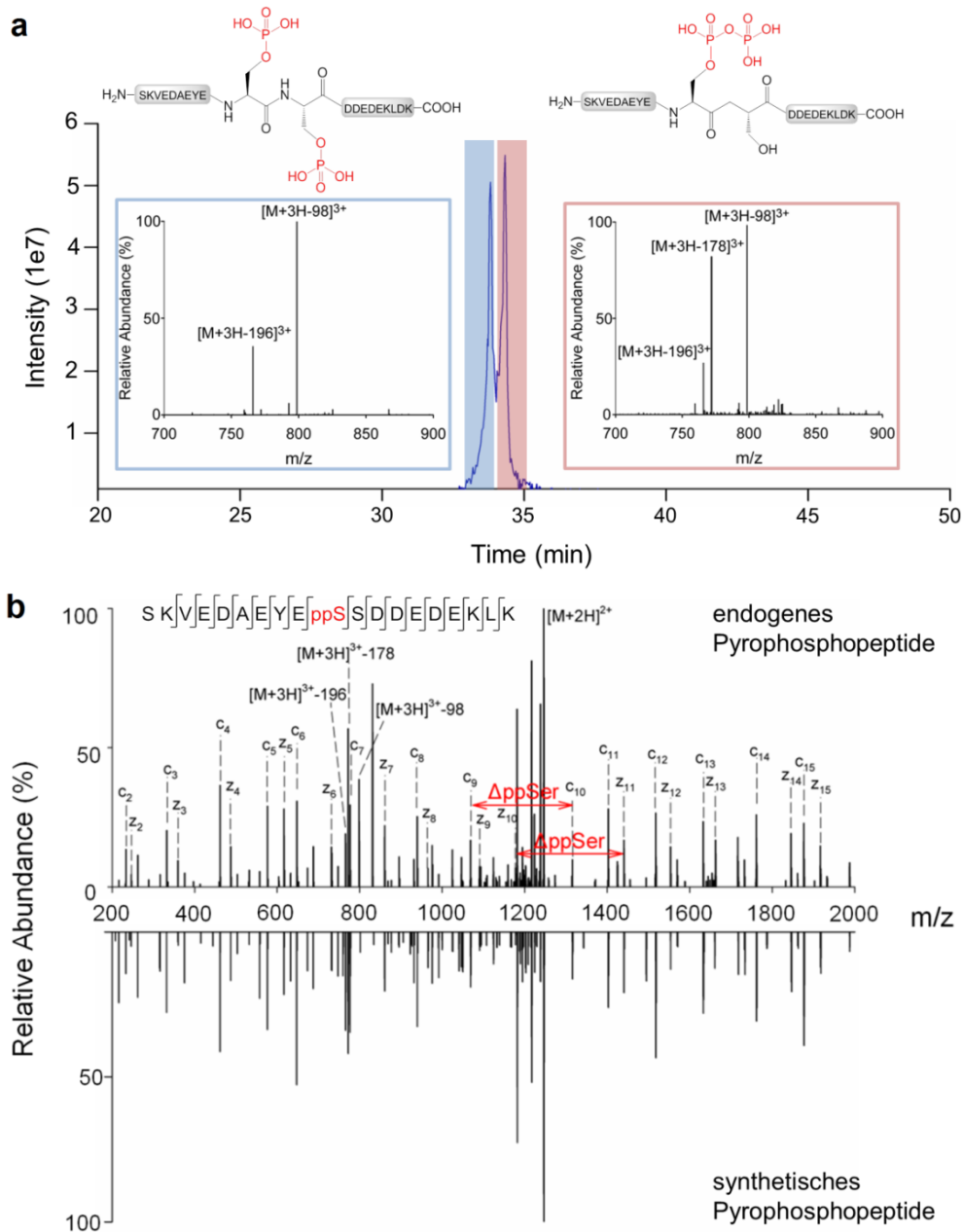


Abbildung 92: Identifizierung der ersten endogenen Proteinpyrophosphorylierung.

(a) Extrahiertes Ionenchromatogramm (XIC) m/z 830,982 des diphosphorylierten Peptides SKVEDAEYEppS-DDEDEKLK (Retentionszeit: 33,8 min) und seines pyrophosphorylierten Gegenspielers SKVEDAEYEppSSD-DDEDEKLK (Retentionszeit: 34,3 min). Die dazugehörigen CID-MS/MS-Spektren zeigen die charakteristischen Neutralverlustmuster eines diphosphorylierten Peptides (98 & 196 Da) und die eines pyrophosphorylierten Peptides (98, 178 & 196 Da). (b) Getriggertes ETHCD-Spektrum und Spaltungsmuster des pyrophosphorylierten Peptides. Die zugeordneten Fragmentationen weisen eine lückenlose Sequenzabdeckung auf, wobei die Fragmente c_{10} und z_{11} die Lokalisierung der Pyrophosphorylierung an Position Ser-10 ermöglichen. Das MS/MS-Spektrum des synthetischen Peptides ist in einem Spiegelbild gegenübergestellt.

Beide Phosphopeptidspezies wurden in verschiedenen technischen Replikaten nachgewiesen. Das Verhältnis zwischen dem di- und dem pyrophosphorylierten Peptid schwankte dabei erheblich. Außerdem wurde die pyrophosphorylierte Sequenz sowohl mit einer weiteren als auch mit einer Fehlsplattstelle weniger gefunden.

Eine weitere Gruppe getriggelter, datenreicher EThcD-Spektren dreifach und vierfach geladener Precursorionen konnte bei der bioinformatisch gestützten Suche nicht identifiziert werden. Eine genauere Betrachtung der CID-Spektren, die das Triggering veranlasst hatten, zeigte, dass es sich dabei mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit um pyrophosphorylierte Peptide gehandelt haben musste. Die Neutralverluste von 98 und 178 Da zählten zu den höchsten Signalen bei einem sehr geringen Grad an Spaltung entlang des Peptidrückgrates. Daher wurden *de novo* Sequenzierungen der EThcD-Spektren durchgeführt. Das gute Signal-zu-Rauschverhältnis und die sehr gute Sequenzabdeckung der Spektren ermöglichte die Identifizierung des Peptides R(-NH₃)SHHDDEEESppSEK. Das Peptid ist Bestandteil RNA-Polymerase I Untereinheit Rpa34 und spiegelte die Pyrophosphorylierung des Proteins an Position Ser-206 wieder. Biochemische Studien hatten bereits gezeigt, dass Rpa34 *in vitro* pyrophosphoryliert wird und die Pyrophosphorylierungsstelle auf die Positionen Ser-205 und Ser-206 eingegrenzt.⁴⁸

Das Peptid wurde sowohl als dreifach und vierfach protonierte Variante als auch mit einer weiteren Fehlsplattstelle identifiziert. Die jeweiligen EThcD-Spektren wiesen eine lückenlose Sequenzabdeckung bis hin zum N-terminalen Arginin auf. Dieses hatte exakt die Masse eines Ammoniakmoleküls verloren. Ob es sich dabei um eine biologische Veränderung oder eine Modifikation während der Probenvorbereitung und Messung handelte, konnte nicht abschließend geklärt werden. Für die Lokalisierung der Pyrophosphorylierungsstelle spielte dies jedoch keine Rolle, da ausreichend Fragmentationen vorhanden waren, um diese zweifelsfrei einzugrenzen.

Aufgrund der Abspaltung von Ammoniak von der Peptidsequenz konnte das Peptid während der datenbankgestützten Suche nicht identifiziert werden. Dies wäre nur möglich gewesen, wenn diese sehr ungewöhnliche Modifikation zuvor in den Suchalgorithmus implementiert worden wäre. Das Beispiel weist jedoch auf einen weiteren wichtigen Vorteil des DDNL-ETHCD-Ansatzes hin. Da die Anzahl zu untersuchender EThcD-Spektren drastisch reduziert wird, sinkt nicht nur der Zeitaufwand der bioinformatischen Auswertung, es bietet sich gleichzeitig die Möglichkeit, einzelne Spektren gezielter zu betrachten. Dieses Vorgehen wäre bei einer konventionellen datenabhängigen Aufzeichnung nicht mit vertretbarem zeitlichen Aufwand zu realisieren.

Ein anderer Ansatz, um solche nicht berücksichtigten Modifikationen bei der Datenbanksuche aufzufangen, verwendet eine sehr große Fehlertoleranz im MS¹-Scan.⁸⁴ Diese Methodik erlaubt zwar unbekannte Modifikationen zu identifizieren, führt jedoch auch zu einer signifikanten Anzahl falschpositiver Zuordnungen und bedarf einer zusätzlichen Validierung.

3.6.8 Neutralverlust getriggerte EThcD- und HCD-Fragmentierung

Neben den ersten identifizierten endogenen Proteinpyrophosphorylierungen wurden weitere Erkenntnisse über die Beschaffenheit der Probe nach der Anreicherung gewonnen. So reichte die Komplexität der Probe nicht an die des Vollproteoms heran. Die überwiegende Anzahl an Peptide war mehrfach phosphoryliert und/oder besaß eine relativ saure Aminosäuresequenz. Des Weiteren traten die identifizierten pyrophosphorylierten Peptide teilweise als doppelt phosphoryliertes Peptid auf. Außerdem war die relative Abundanz der identifizierten Precursorionen, welche eine Pyrophosphorylierung trugen, zum Teil äußerst gering. Basierend auf diesen Erkenntnissen erfolgte eine Weiterentwicklung der bestehenden Triggermethode (Triggermethode 2. Generation). Diese sollte die Komplexität der Probe berücksichtigen, über eine noch höhere Empfindlichkeit verfügen und einen größeren dynamischen Bereich bei vergleichbarer Robustheit abdecken.

Ein wesentlicher Aspekt bei der datenabhängigen Aufzeichnung ist die Erkennung einer möglichst großen Anzahl an Precursorionen im MS¹-Scan. Darauf basierend werden die Precursorionen tandem-massenspektrometrisch erfasst. Dies setzt allerdings voraus, dass im Übersichtsspektrum das Isotopenmuster der Precursorionen erkannt wird und sich der Ladungszustand ableiten lässt. In der Orbitrapzelle ist die Anzahl an Ionen, welche für ein Übersichtsspektrum gesammelt werden können, begrenzt. Demzufolge ist auch der dynamische Bereich, welcher erreicht werden kann, limitiert (vgl. Kapitel 1.2). Um einen möglichst großen dynamischen Bereich im MS¹-Scan zu erreichen, wurde die Anzahl an Ionen (AGC-Targetwert) im Vergleich zur vorangegangenen Methodik verdoppelt (vgl. Tabelle 6). Ein Prozedere, welches jedoch nur bei Proben mit einer ausreichend hohen Komplexität sinnvoll ist. Sollte dies nicht gegeben sein und die Orbitrapzelle vorwiegend mit einer Precursorionenspezies gefüllt werden, kann dies zu Raumladungseffekten führen, welche die Massengenauigkeit signifikant reduzieren.³¹⁰

Neben der Vergrößerung des dynamischen Bereiches innerhalb des MS¹-Scans wurde eine weitere Veränderung vorgenommen. Für den Filterscan wurden die Precursorionen wiederum mittels CID und reduzierter CE fragmentiert, die Detektion erfolgte aber in diesem Fall in der Orbitrapzelle mit einer Auflösung von R=15.000. Dies hatte Folgen für die gesamte massenspektrometrische Methode: Da MS¹ und MS²-Spektren in der Orbitrapzelle detektiert wurden, war die parallele Erfassung beider Spektren nicht mehr gegeben, sodass die Methode etwas an Geschwindigkeit verlor. Um nicht zu viele MS/MS-Spektren durch ein langes MS¹ zu verlieren, wurden daher die Auflösung des Übersichtsspektrums und damit verbunden die Messzeit für das Übersichtsspektrum halbiert. Trotz der Halbierung der Auflösung konnte keine signifikante Reduktion der Anzahl an erkannten Precursorionen im MS¹ beobachtet werden.

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 6: Gegenüberstellung der wichtigsten Parameter der Triggermethoden 1. und 2. Generation

	Triggermethode erste Generation	Triggermethode zweite Generation
MS ¹ Bedingungen		
AGC-Targetwert	2e5	4e5
Maximale Injektionszeit	50 ms	50 ms
Interne Kalibrierung mittels EASY-IC	X	-
Auflösung (R)	120.000	60.000
Intensitätsschwellwert	2e5	5e4
Ladungszustände	2-4	2-4
Dynam. Ausschlusszeit	20 s	20 s
CID MS/MS Bedingungen (Filterscan)		
AGC-Targetwert	5e3	1e4
Durchs. Injektionszeit	ca. 30-35 ms	ca. 60-70 ms
Maxim. Injektionszeit	50 ms	100 ms
Reaktionszeit für Fragmentierung	10 ms	10 ms
Detektion	Ionenfalle	Orbitrap (R=15.000)
Messzeit incl. Ionentransfer		23.5 ms
Injektion von Precursorionen bei verfügbarer Zeit	X	X
MS/MS Detektion parallel zu MS ¹ -Aufzeichnung	Gegeben	Nicht gegeben
Durchs. Anzahl MS/MS pro Sekunde	11-14	10-13
Maxim. Anzahl MS/MS pro Sekunde	ca. 20	ca. 15
Neutralverlusttrigger		
Berücksichtigte Signale	Neutralverluste: 98 & 178 Da	Neutralverlust: 177,943 Da
Kriterien	Top N; 15% relative Abundanz; Massenfehler: ±0,5 Da	15% relative Abundanz, Massenfehler: ±20 ppm
		Ladungszustandes des Tochterions
Getriggerte MS/MS Experimente		
EThcD	X	X
AGC-Targetwert	1e5	1e5
Maximale Injektionszeit	500 ms	2000 ms
Zusätzliche Aktivierung	NCE 50% und 30%	NCE 30%
Detektion	Orbitrap (R=15.000)	Orbitrap (R=60.000)
Massenbereich	<i>m/z</i> 200-2000	<i>m/z</i> 200-3000
HCD MS/MS		
AGC-Targetwert	-	5e4
Maximale Injektionszeit	-	500 ms
Kollisionsenergie	-	NCE 30%
Detektion	-	Orbitrap (R=30.000)

Außerdem verliert man durch das hochaufgelöste MS² etwas an Empfindlichkeit, da die Fragmentionen nicht direkt in der Ionenfalle ausgelesen werden, sondern aus der Ionenfalle in die Orbitrapzelle

geschickt werden müssen. Um der Rechnung zu tragen, wurden der Targetwert und die maximale Injektionszeit verdoppelt. Diese Maßnahmen führten dazu, dass sich die mögliche Anzahl an MS/MS pro Sekunde reduzierte. Für die Messung der angereicherten und fraktionierten Proben spielte dies jedoch eine untergeordnete Rolle, da der Filterscan dennoch schnell genug war, um erkannte Precursorionen zu fragmentieren. Die maximale Injektionszeit zum Erreichen des Targetwertes wurde so gewählt, dass diese bei einem Signal, dessen Intensität ca. eine Größenordnung über dem Rauschen lag, komplett genutzt wurde. Dies gewährleistete, dass auch Precursorionen mit äußerst niedriger relativer Abundanz zuverlässig erfasst wurden, ohne unnötig an Geschwindigkeit zu verlieren.

Auf der anderen Seite wurde Precursorionen mit einer hohen relativen Abundanz ermöglicht den vorgegeben Targetwert zu überschreiten. Dies ist sinnvoll, wenn die Orbitrapzelle die Messung des vorangegangenen MS¹ oder MS² noch nicht abgeschlossen hat. Dies sei an einem konkreten Beispiel erläutert: Der Iontentransfer der Fragmentionen aus der Ionenfalle bis in die Orbitrapzelle und die dortige Messung bei einer Auflösung von $R=15.000$, nehmen ca. 23,5 ms in Anspruch. Erreicht beispielsweise ein Precursorion bereits nach 10 ms den vorgegebenen Targetwert und damit vor Beendigung der Messung des vorangegangenen MS² in der Orbitrapzelle, so werden die restlichen 13,5 ms genutzt, um weitere Precursorionen dieser Spezies zu sammeln. Somit werden die Zeit für das Sammeln der Ionen in der Ionenfalle und die Messzeit in der Orbitrapzelle ideal ausgenutzt. Diese Methodik erhöht die Qualität der MS²-Spektren, ohne an Schnelligkeit zu verlieren.

Der Wechsel zu einem optimierten, hochaufgelösten CID-Filterscan bot die Möglichkeit, die Triggerkriterien zu spezifizieren. In der Triggermethode der ersten Generation waren die Triggeranforderungen erfüllt, wenn die Neutralverluste von 98 und 178 Da zu den höchsten Signalen zählten und eine bestimmte relative Abundanz aufwiesen. Da die CID-Spektren in der Ionenfalle detektiert wurden, wurde ein Massenfehler von $\pm 0,5$ Da für die Erkennung der Signale zugelassen. Da die überwiegende Anzahl an fragmentierten Precursorionen von Phosphopeptiden stammte, wurde der Neutralverlust von 98 Da hoch frequent detektiert. Demzufolge blieb nur der Neutralverlust von 178 Da als einzig relevantes Merkmal zur Erkennung eines pyrophosphorylierten Peptides. Aufgrund des relativ großen m/z -Bereiches, hervorgerufen durch die geringe Massengenauigkeit der Ionenfalle, in dem dieses diagnostische Fragmention enthalten sein konnte, trat vielfach ein falschpositives Triggering, beispielsweise hervorgerufen durch Fragmente des Peptidrückrates, auf. Die hohe Massengenauigkeit des hochaufgelösten CID-Filterscans ermöglichte es allerdings, den m/z -Bereich beträchtlich zu verkleinern. Ein zusätzliches ETHCD-Spektrum wird nur noch getriggert, wenn der Neutralverlust von 177,943 Da innerhalb eines Bereiches von ± 20 ppm auftritt. Dies führte zu einer signifikanten Reduktion an falschpositiv getriggerten MS².

Weitaus bedeutender war allerdings, dass sich anhand der Isotopenmuster die Ladungszustände der Fragmentionen bestimmen ließen. Da bei einem Neutralverlust die Abspaltung eines Moleküls erfolgt, weisen das entstehende Fragmention und das dazugehörige Precursorion den gleichen Ladungszustand auf. Dies ist bei Fragmentierungen des Peptidrückrates meist nicht der Fall, da sich hier die

Ladungen auf die verschiedenen Bruchstücke verteilen. Dementsprechend wurde die Erkennung des korrekten Ladungszustandes (z) als ein weiteres Triggerkriterium hinzugefügt und somit die Spezifität der Triggerkonditionen nochmals signifikant erhöht.

Im DDNL-ETHcD-Ansatz der ersten Generation wurde zur Erhöhung der Massengenauigkeit im MS¹-Scan eine interne Kalibrierung mittels EASY-IC vorgenommen. In der weiterentwickelten Triggermethode wurde davon abgesehen, da eine sinnvolle Verwendung dieser Lockmasse auf der Ebene des MS² nicht möglich ist. Der Einsatz der Lockmasse bei der Aufzeichnung des MS¹ und dessen Verzicht im MS² könnten zu unerwünschten Massenverschiebungen führen und die sichere Erkennung des Neutralverlustes von 177,943 Da in dem schmalen Fenster von ± 20 ppm gefährden. Regelmäßiges Kalibrieren der Orbitrapzelle gewährleistete eine ausreichend hohe Massengenauigkeit ≤ 3 ppm auf MS¹-Ebene und eine nur geringfügig schlechtere Massengenauigkeit auf MS²-Ebene.

Die detaillierte, bioinformatisch gestützten Untersuchungen des Fragmentierungsverhaltens doppelt geladener labil phosphorylierter Peptide zeigten, dass eine zusätzliche Aktivierung von 30% die besten Ergebnisse bei der Identifizierung pyrophosphorylierter Peptide ergab (vgl. Kapitel 3.2.3). Dies wurde in dem überarbeiteten Entscheidungsbaum berücksichtigt und eine Angleichung der ETHcD-Fragmentierungsbedingungen für alle Ladungszustände vorgenommen.

Ein großer Anteil an getriggerten Spektren wurde von relativ langen Peptiden eingenommen. Exemplarisch dafür sei auf das endogene, pyrophosphorylierte Peptid SKVEDAEYEppSSDDEDEKLKD hingewiesen. Im Idealfall treten bei der ETHcD-Fragmentierung alle komplementären Ionenserien (c/z & b/y) auf, sodass eine lückenlose Sequenzabdeckung gewährleistet ist. In der Praxis lässt sich jedoch meist nur eine Ionenserie detektieren. Da durch den ETD-Prozess vorwiegend einfach geladene Fragmentationen entstehen, kann dies bei einem gebräuchlichen m/z -Scanbereich von 200-2000 dazu führen, dass große relevante Fragmentationen nicht erfasst werden. Auf der anderen Seite lässt sich jedoch der m/z -Scanbereich nicht beliebig weit nach oben hin öffnen, ohne an Empfindlichkeit und Massengenauigkeit zu verlieren. Die höchste Auflösung und Massengenauigkeit weist die Orbitrapzelle auf, wenn die untere Grenze einem Viertel der oberen Grenze des Messbereiches entspricht. Dies würde beispielsweise bei einem m/z -Bereich von 400-1600 der Fall sein. Unter Berücksichtigung dieser Limitierung und der Anforderung Fragmentationen mit großem m/z -Verhältnis ausreichend sequenzieren zu können, wurde der m/z -Scanbereich auf 200-3000 erweitert.

Trotz der hohen Fragmentierungseffizienz von ETHcD war eine Identifizierung aller getriggerten Spektren nicht möglich. Da auch die dazugehörigen CID-Spektren meist einen geringen Informationsgehalt aufwiesen, blieb eine signifikante Anzahl an Precursorionen unerkannt. Um dem Rechnung zu tragen, wurde ein zusätzlicher HCD-Scan implementiert. Dieser erfolgte unmittelbar nach dem getriggerten ETHcD-Spektrum. Auch wenn die HCD-Fragmentierung meist keine direkte Lokalisierung einer Pyrophosphorylierungsstelle zulässt, bestand zumindest die Möglichkeit der Sequenzidentifizierung mit Hilfer dieser Technik. Darüber hinaus sind die gebräuchlichen, proteomischen Suchmaschinen für die Identifizierung von b - und y -Ionen optimiert (vgl. Abbildung 93).

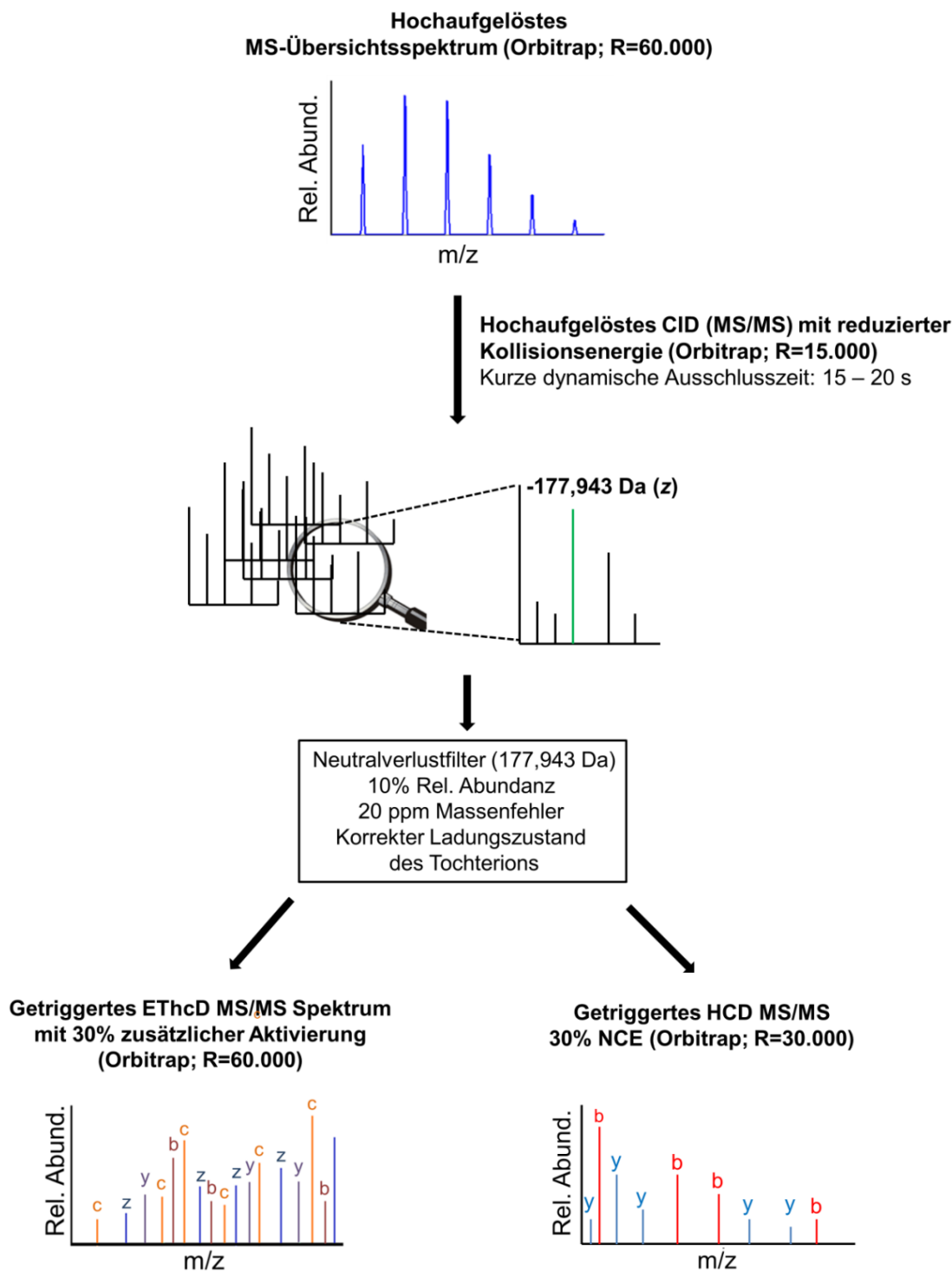


Abbildung 93: Schema des datenabhängigen neutralverlustgetriggerten EThcD/HCD-Ansatzes (DDNL-EThcD/HCD) der zweiten Generation.

Zuletzt galt es, die Empfindlichkeit der Methode nochmals zu erhöhen. Dazu wurden verschiedene Parameter optimiert: Der Schwellwert, ab welcher Signalintensität ein MS/MS-Spektrum getriggert wird, wurde herabgesetzt. Signale, die in diesem Bereich auftreten, lassen sich selten einem Ladungszustand zuordnen und nehmen die komplette Füllzeit des CID-Filterscans in Anspruch. In der Praxis

werden Signale in diesem Intensitätsbereich äußerst selten fragmentiert. Darüber hinaus wurden die maximalen Füllzeiten für die getriggerten Spektren nochmals verlängert. Dies sollte ermöglichen, dass sich auch bei sehr niedrig abundanten Precursorionen ausreichend Ionen für ein aussagekräftiges Spektrum sammeln lassen. Außerdem wurde die Auflösung für beide getriggerten Fragmentierungstechniken erhöht, um die Massengenauigkeit und das Signal-zu-Rauschverhältnis zu verbessern. Bezüglich des getriggerten EThcD-Spektrums bedeutet dies keinen zusätzlichen Verlust an Geschwindigkeit, da das darauf folgende getriggerte HCD-Spektrum eine lange Injektionszeit beansprucht.

3.6.9 Identifizierung endogener Proteinpyrophosphorylierungen in HEK 293-Zellen

Für die Identifizierung der ersten endogenen Proteinpyrophosphorylierungen einer humanen Zelllinie wurde anfangs durch Herrn Harmel in der Arbeitsgruppe von Prof. Fiedler die gleiche Anreicherungs- und Probenvorbereitungsstrategie wie bei der Analyse der Hefeproteome gewählt. Nach der Kultivierung der HEK 293-Zellen erfolgte deren Aufschluss und die Isolation der im Zelllysat enthaltenen Proteine. Diese wurden reduziert und alkyliert sowie mit Trypsin verdaut. Das komplexe Peptidgemisch wurde anschließend mit dem pyropeptidspezifischen Anreicherungsreagenz behandelt und das entsalzte Eluat mit der Triggermethode der zweiten Generation untersucht. Der Nachweis eines pyrophosphorylierten Peptides gelang auf diesem Wege nicht. Die Gründe dafür waren vielfältig: Zum Einen war die erhaltene Probe im Vergleich zu den Studien des Hefeproteoms erheblich komplexer, zum anderen betrugen die Konzentrationsunterschiede zwischen den niedrig- und höchstabundantesten Precursorionen bis zu fünf Größenordnungen und überstiegen damit den dynamischen Bereich des Systems. Nicht zuletzt stand die Frage im Raum, ob Proteinpyrophosphorylierungen überhaupt in einem humanen Proteom existieren.

Zur Klärung dieser Frage und um eine größere analytische Tiefe zu erreichen, wurde nach Zn-DPA-Anreicherung die in Kapitel 3.5.2.1 diskutierte RP-HPLC-Fraktionierung unter schwach basischen Bedingungen in den Workflow implementiert. In dessen Folge gelang die Identifizierung der ersten Proteinpyrophosphorylierung in einer humanen Zelllinie. Das aufgezeichnete CID-MS/MS Fragmentenspektrum wies das charakteristische Neutralverlust auf, wobei der Verlust von 177,943 Da das höchstabundanteste Signal darstellte. Das daraufhin getriggerte EThcD-Spektrum profitierte maßgeblich von dem erweiterten Scanbereich für das MS². Nur so war es möglich die drei diagnostischen Fragmentionen c₁₉, y₃ und z₃ aufzuzeichnen und eine weitere Phosphorylierung an dem benachbarten Threoninrest auszuschließen. Dass keine doppelt phosphorylierte Spezies auftrat, ist durch das extrahierte Ionenchromatogramm dokumentiert (vgl. Abbildung 94). Die Peptidsequenz ließ sich der dualspezifischen Proteinkinase CLK1 zuordnen und dokumentiert deren Pyrophosphorylierung an Position Ser-383. Interessanterweise befindet sich in diesem Teil des Proteins in unmittelbarer Nachbarschaft der Pyrophosphorylierungsstelle kein saurer Aminosäureabschnitt, wie oftmals

angenommen. Möglicherweise sind jedoch die enthaltenen Histidinreste an der Vermittlung der Pyrophosphorylierung beteiligt.

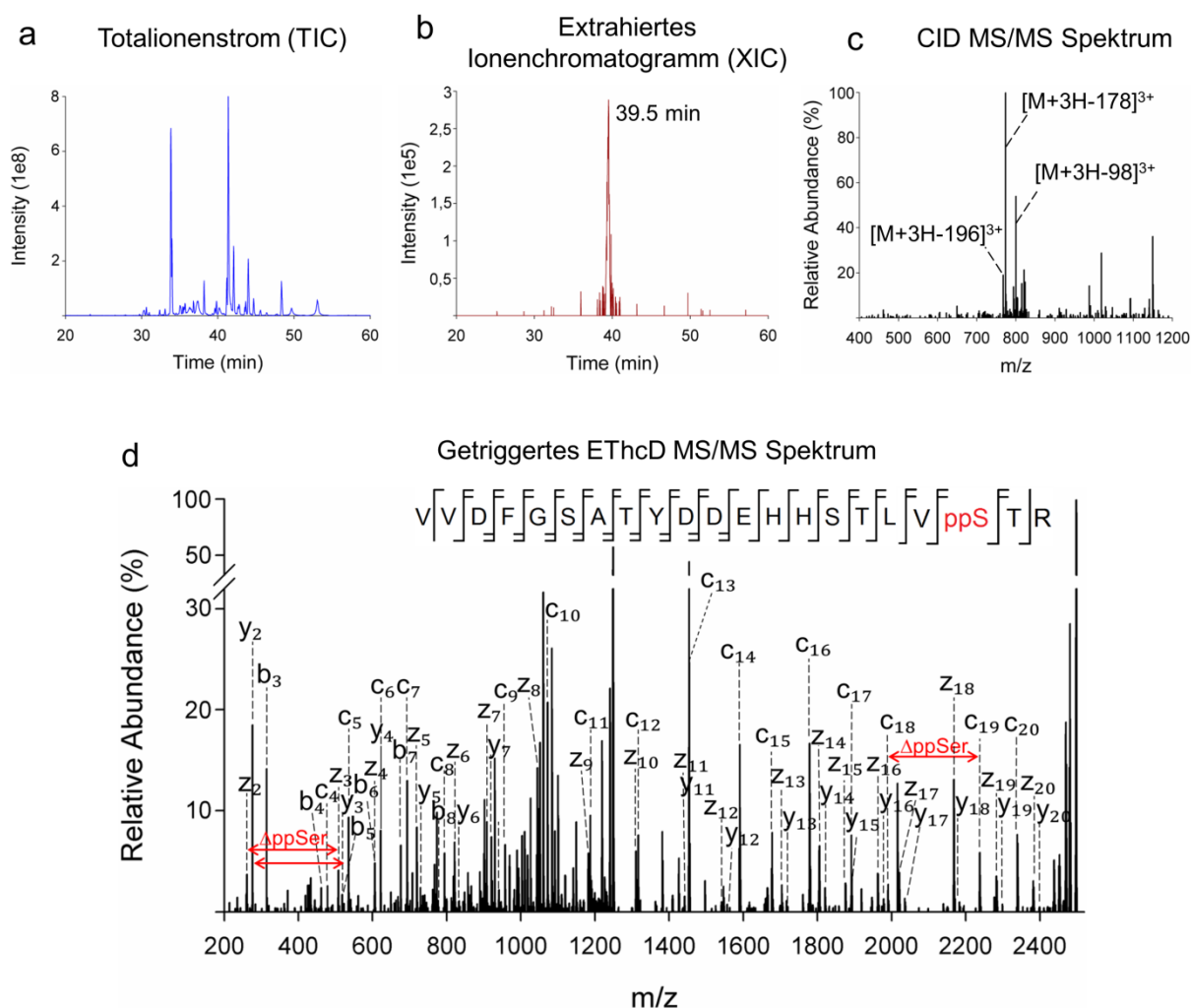


Abbildung 94: Erste endogene Proteinpyrophosphorylierung in humaner Zelllinie.

(a) Totalionenstrom (TIC) der pyrophosphopeptidenthaltenden RP-HPLC-Fraktion. (b) Extrahiertes Ionenchromatogramm (XIC) m/z 832,676, welches ausschließlich den Peak des pyrophosphorylierten Peptides VVDFGSATYDDEHHSTLVppSTR zeigt. (c) CID-MS/MS Spektrum mit charakteristischem Neutralverlustmuster, wobei die Neutralverlust von 178 und 98 die höchstabundantesten Signale stellen. (d) Getriggertes EThcD-Spektrum mit einer lückenlosen Sequenzabdeckung und den drei diagnostischen Fragmentationen c_{19} , y_3 und z_3 , welche eine zweifelsfreie Lokalisierung der Pyrophosphorylierung gewährleisten.

Weitere Fortschritte auf dem Gebiet der Anreicherung und Fraktionierung durch Dr. Morgan aus der Gruppe von Prof. Fiedler ermöglichten die Identifizierung weiterer endogener Proteinpyrophosphorylierungen in HEK-Zellen. Die dazugehörigen Chromatogramme und Spektren sind dem Anhang zu

entnehmen und sollen an dieser Stelle nicht weiter im Detail diskutiert werden. Vielmehr gilt es das Potential aber auch die Grenzen der Methode zu beleuchten.

Betrachtet man die CID-Spektren der identifizierten pyrophosphorylierten Peptide, so fällt auf, dass der charakteristische Neutralverlust von 177,943 Da stets zu den drei abundantesten Fragmentationen gehört und selbst bei sehr langen Peptiden und diversen sauren Aminosäureresten (z.B. KPATPAED-DEDDDEDLFGppSDNEEEDKEAAQLR) eine relative Häufigkeit von mindestens 30% aufweist (vgl. Tabelle 7). Im Umkehrschluss bedeutet dies, dass man die Triggerkriterien durch Erhöhung des Schwellwertes womöglich zusätzlich spezifizieren und die Anzahl falsch positiv getriggelter MS/MS-Spektren reduzieren könnte.

Tabelle 7: Relative Intensität und Top N des Neutralverlustes von 177,943 Da sowie die Signalintensität der identifizierten endogenen Pyrophosphopeptide.

Peptidsequenz	Relative Intensität (%) des Neutralverlustes von 177,943 Da	NL 177,943 Da N*	Signalintensität Precursorion
VVDFGSATYDDEHHSTLVppSTR	100	1	2,9e5
YppSGAYGASVSDEELK	100	1	1,6e5
KPATPAEDDEDDDEDLFGppSDNEEEDKEAAQLR	30	3	2,3e5
CGSGPVHISGQHLVAVEEDAEPpSEDEEEEDVK	42	2	1,8e5
ESEDKPEIEDVGppSDEEEEEKDGDK	43	3	1,2e5
VMLGEppTNPADSKPGTIR	100	1	6,0e4
FQppSEEQQTEDELQDK	88	2	6,7e6

*N=1 entspricht dem Basepeak, N=2 dem zweitabundantesten Signale des Spektrums usw.

Die Implementierung eines hochaufgelösten HCD-Spektrums erleichtert nicht nur die Identifizierung der jeweiligen Peptidsequenz, sie liefert auch zusätzlich wertvolle Informationen zur Charakterisierung einer Modifikation. Beispielsweise sind für die Aminosäuresequenz YppSGAYGASVSDEELK der MICOS Komplex Untereinheit MIC 19 sowohl Phosphorylierungen des Tyrosin- als auch des Serinrestes am *N*-Terminus des Peptides beschrieben, sodass eine gleichzeitige Phosphorylierung bei der Spezies ausgeschlossen werden musste.^{153, 311} Das dazugehörige HCD-Spektrum enthält das Fragmentation b_2 , das unmodifizierte Fragment b_1 fehlt jedoch, sodass eine sichere Differenzierung zwischen der di- und der pyrophosphorylierten Spezies anhand der Fragment nicht möglich ist. Dennoch lässt sich die Pyrophosphorylierung zweifelsfrei ableiten, da Tyrosinphosphorylierungen unter den eingesetzten Fragmentierungsbedingungen ein charakteristisches Phosphoimmoniumion (m/z 216,043) bilden und dieses in dem Fragmentspektrum abwesend ist (vgl. Abbildung 95a).^{130, 179} Unabhängig davon weist das getriggerte ETHCD-Spektrum des doppelt geladenen Precursorions eine lückenlose Se-

quenzabdeckung mit den diagnostischen Fragmenten y_{14} und z_{14} auf und untermauert die Existenz der Pyrophosphorylierung (vgl. Abbildung 95b).

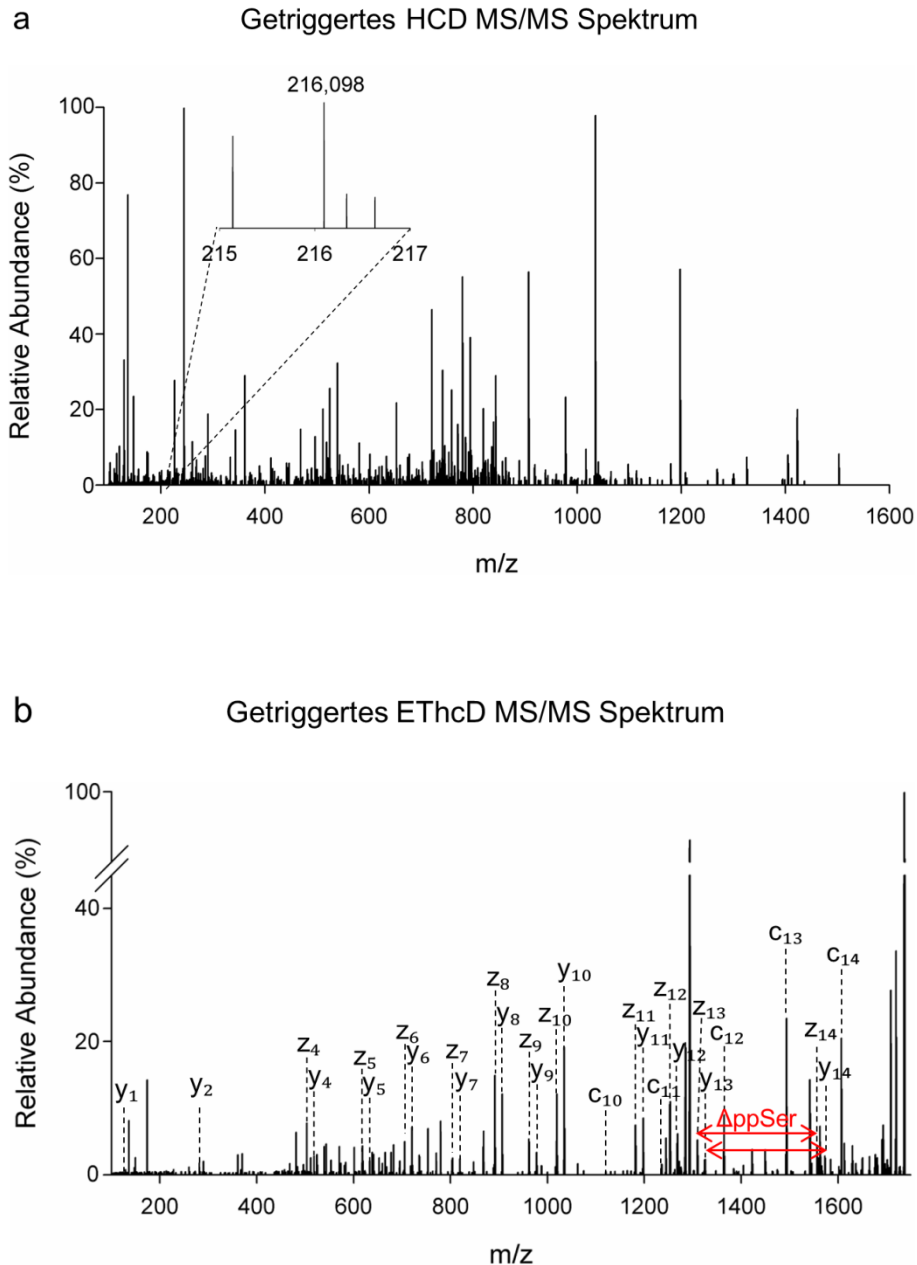


Abbildung 95: Dokumentation der endogenen Pyrophosphorylierung des Peptides YppSGAYGASVSDEELK mittels HCD- und ETHcD-Spektren.

(a) HCD-Spektrum, welches kein Phosphoimmoniumion des Tyrosins (m/z 216.043) aufweist, sodass eine Diphosphorylierung des Tyrosin- und Serinrestes an den Positionen eins und zwei im Peptid ausgeschlossen werden kann. (b) ETHcD-Spektrum mit einer lückenlosen Sequenzabdeckung und den diagnostischen Fragmentationen y_{14} und z_{14} auf, welche die Pyrophosphorylierung zweifelsfrei dokumentieren.

Neben der erhöhten Zuverlässigkeit verschiedene Phosphorylierungen zu unterscheiden, bietet der zusätzliche HCD-Scan einen weiteren Vorteil. Für die empfindliche und reproduzierbare Quantifizierung von Proteinmodifikationen wird vermehrt auf datenunabhängige Aufzeichnungsmethoden (DIA) mit Hilfe der HCD-Fragmentierung zurückgegriffen. Zuvor werden dafür in aller Regel Spektrenbibliotheken relevanter Peptide angelegt. Durch die Implementierung des HCD-Scans entfällt dieser zusätzliche Schritt, da das benötigte Referenzspektrum bereits aufgezeichnet wurde.

Eine genaue Betrachtung der Signalintensitäten der Precursorionen der identifizierten Peptide zeigt, dass diese äußerst niedrig abundant waren. Ein Beispiel ist die Identifizierung der ersten endogenen Threoninpyrophosphorylierung der Nukleosiddiphosphatkinase A an Position Thr-94. In Abbildung 96 sind dazu der Totalionenstrom sowie diverse extrahierte Ionenchromatogramme in einem Retentionszeitenfenster von 41 bis 43 min dargestellt.

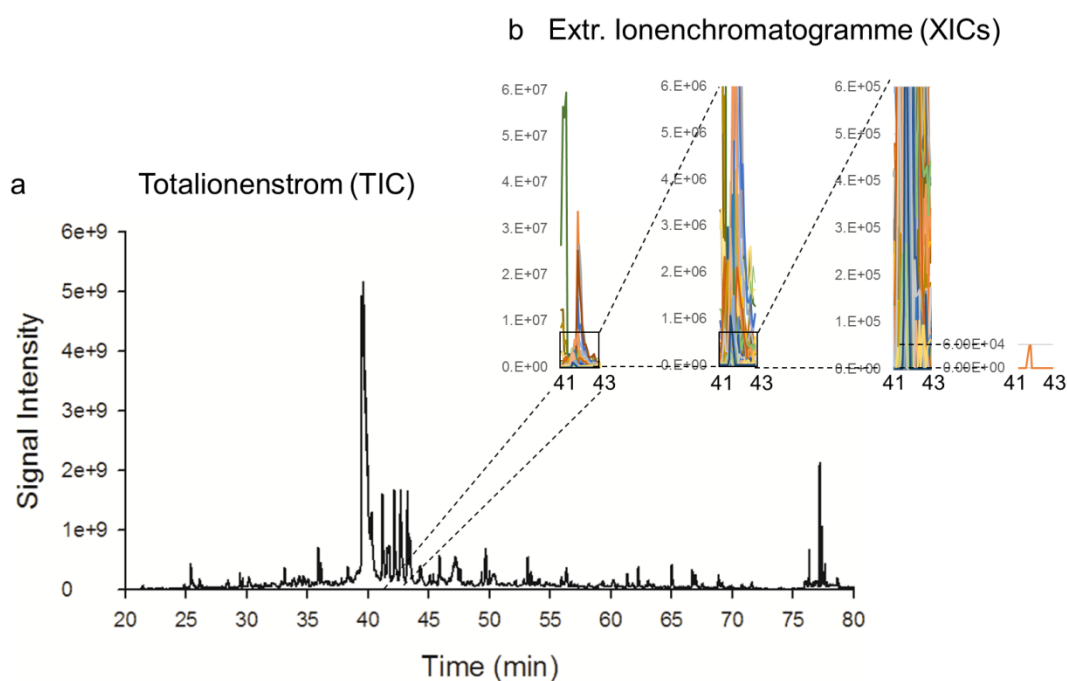


Abbildung 96: Nachweis der ersten endogenen Threoninpyrophosphorylierung.

(a) Totalionenstrom (TIC) und (b) diverse extrahierte Ionenchromatogramme (XICs) einer Probe, welche die erste endogene Threoninpyrophosphorylierung des Peptides VMLGEppTNPADSKPGTIR (Signalintensität $\approx 6e4$) enthält. Die Abbildung verdeutlicht die erheblichen Intensitätsunterschiede und die Komplexität der Probe.

Dem TIC ist zu entnehmen, dass das höchstabundanteste Precursorion eine Signalintensität $> 5e9$ aufweist. Konzentriert man sich auf das Intervall von 41 bis 43 min Retentionszeit, so lassen sich die XICs zahlreicher Precursorionen mit Intensitäten $> 6e6$ erkennen. Betrachtet man anschließend den Intensitätsbereich $< 6e6$ so ist eine Unterscheidung der extrahierten Ionenchromatogramme anhand der

Grafik aufgrund der Zunahme der Komplexität nicht mehr möglich. Diese Tendenz setzt sich für den Intensitätsbereich $< 6e5$ fort. Summa summarum wurden innerhalb dieses Intervalls mehr als 100 Precursorionen mit dem entsprechenden Ladungszustand erfasst und einer Fragmentierung zugeführt. Darunter befand sich ein Precursorion mit einer Signalintensität von ca. $6e4$ im Peakmaximum. Für das dazugehörige CID-Spektrum im Filterscan wurde die maximale Injektionszeit benötigt. Dennoch reichte der Informationsgehalt des Spektrums aus um den charakteristischen Neutralverlust von 177,943 Da und dessen Ladungszustand zu erkennen, sodass ein EThcD- und ein HCD-Spektrum getriggert werden konnten (vgl. Abbildung 97). Auch deren Injektionszeiten wurden wiederum vollkommen ausgenutzt. Dessen ungeachtet wurde die Peptidsequenz mit einem hohen Sequest Xcorr Score identifiziert und die Pyrophosphorylierungsstelle mit einer sehr hohen *ptmRS* Positionswahrscheinlichkeit lokalisiert.

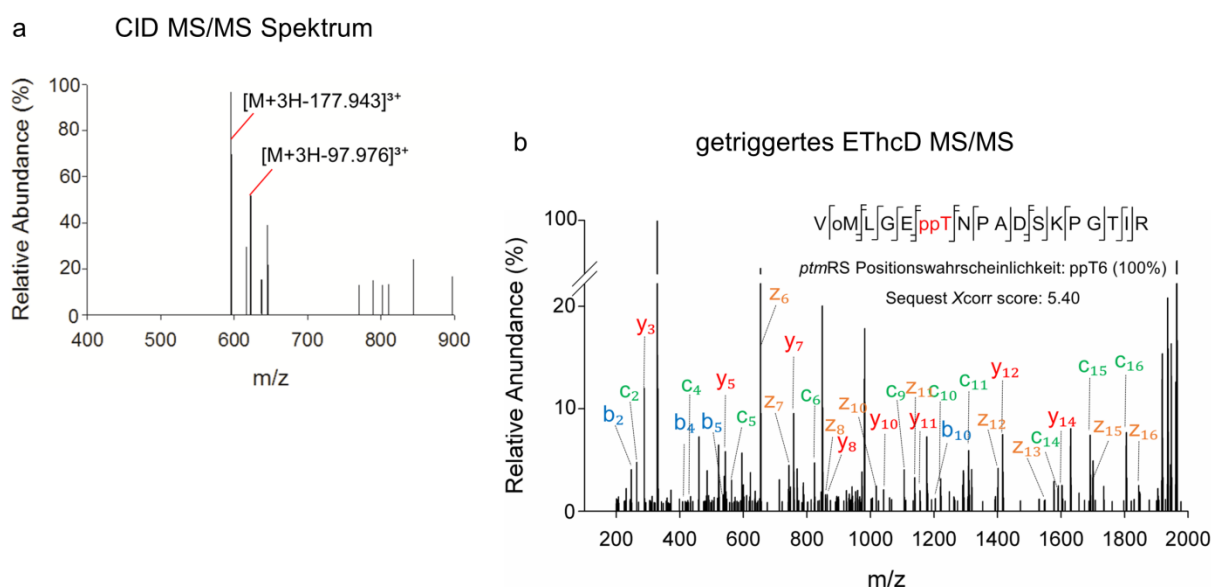


Abbildung 97: Nachweis der ersten endogenen Threoninpyrophosphorylierung II.

(a) CID-MS/MS-Spektrum mit Neutralverlustmuster des endogenen pyrophosphorylierten Peptides VMLGE-ppTNPADSKPGTIR. (b) Getriggertes EThcD-Spektrum mit Sequenzabdeckung, *ptmRS* Positionswahrscheinlichkeit und Sequest Xcorr Score.

Hervorzuheben ist, dass trotz Anreicherung und Fraktionierung die Intensität des Precursorions drei Größenordnungen kleiner als das des höchstabundantesten coeluierenden Precursors und sogar fünf Größenordnungen als das höchstabundanteste Signal des gesamten Chromatogramms ist. Dieses Beispiel demonstriert eindrucksvoll das Potential der Triggermethode der zweiten Generation, zeigt aber auch inhärente technologische Limitierungen auf. Zum einen ermöglichte es der sehr schnelle und hochselektive CID-Filterscan die zahlreichen Precursorionen innerhalb des Retentionszeitfensters zu erfassen und schließlich auch das äußerst, niedrig abundante Precursorion von Interesse mit ausrei-

chender Zeit zu fragmentieren und nur von diesem die zusätzlichen HCD- und EThcD-Spektren zu triggern. Zum anderen gewährleisteten die ungewöhnlich langen Injektionszeiten der getriggerten Spektren, dass genügend Ionen für ein aussagekräftiges Spektrum gesammelt werden konnten.

Voraussetzung für diese Kaskade ist eine erfolgreiche Erkennung des Isotopenmusters und daraus resultierend die Bestimmung des Ladungszustandes im MS-Scan. Eine Problematik von aktueller Relevanz, wie die Entwicklung verbesserter Algorithmen zur Precursorionenerkennung zeigt.³¹² Diese Weiterentwicklungen greifen jedoch nur, wenn die dafür benötigten Signale im MS¹ auch detektiert werden. Der begrenzte dynamische Bereich der Orbitrapzelle kann dies verhindern. Im konkreten Beispiel wird dieser ausgereizt und reicht aus um den Ladungszustand zu bestimmen. Angenommen das pyrophosphorylierte Peptid wäre ca. 1 min früher eluiert, so ist davon auszugehen, dass der Ladungszustand des dazugehörigen Precursorions im MS¹-Scan nicht detektiert und somit das Ion auch nicht im CID-Filterscan erfasst worden wäre. Mittelfristig ist diese Problematik nur durch eine selektivere Anreicherung pyrophosphorylierter Peptide bzw. einer wirkungsvolleren Abtrennung nicht pyrophosphorylierter Peptide zu lösen.

3.6.10 Identifizierte, endogene Proteinpyrophosphorylierungen

Summa summarum wurden im Zuge dieser Arbeit erstmals zwei endogene Proteinpyrophosphorylierungen in Hefezellen und elf in HEK 293 Zellen zugeordnet. Darüber hinaus wurde in beiden Proteomen jeweils eine Position nachgewiesen, welche mit hoher Wahrscheinlichkeit pyrophosphoryliert war, bei der jedoch andere Phosphorylierungsmuster nicht abschließend ausgeschlossen werden konnten (vgl. Tabelle 8). Tendenziell tritt die Modifikation voranging in Aminosäuresequenzen auf, welche zahlreiche saure Aminosäurereste in unmittelbarer Nachbarschaft zur Modifikation aufweisen. Außerdem besitzen die Peptide meist weitere potentielle Modifizierungsstellen, die es zu unterscheiden gilt. Beides steht im Einklang mit dem postulierten Mechanismus der Bildung einer Proteinpyrophosphorylierung *in vivo* (vgl. Kapitel 3.6). Des Weiteren weisen die identifizierten Peptide eine relativ hohe Anzahl an Fehlsplattstellen auf. Dies ist unter anderem in der negativ geladenen Modifikation begründet. Auffällig ist, dass einzelne Proteine aus verschiedenen Proteomen sowohl als doppelt als auch als pyrophosphoryliert vorlagen (Rrp5 (Hefe), HNRNPD (HEK 293)).

Ein Vergleich der in HEK 293 identifizierten Pyrophosphorylierungsstellen mit literaturbekannten Phosphorylierungsstellen zeigt, dass für die identifizierten Proteine bereits eine Serinphosphorylierung an der gleichen Position beschrieben ist. Dieses Ergebnis geht ebenfalls konform mit der These, dass für die Bildung einer Pyrophosphorylierung zuvor eine Phosphorylierung stattgefunden haben muss (vgl. Kapitel 3.6). Darüber hinaus ist den in der Literatur aufgeführten großen Phosphoproteomikansätzen zu entnehmen, dass zum Teil in unmittelbarer Nachbarschaft weitere Phosphory-

Ergebnisse und Diskussion

lierungen zugeordnet wurden (siehe Anhang). Dies legt den Verdacht nahe, dass diese Phosphorylierungen womöglich falsch zugeordnet wurden oder diese Spezies ebenfalls als doppelt- und pyrophosphoryliert vorliegt.

Tabelle 8: Zusammenfassung aller endogene Proteinpyrophosphorylierungen und deren Herkunft.

Peptidsequenz	Konfidenz*	Protein (Genname)	Posit.	Herkunft
SKVEDAEYEppSSDDEDEKLDK	++	RNA Bindungsprotein (Rrp5)	S206	<i>S.cerevisiae</i>
R(-NH ₃)SHHDDEESppSEKK	++	RNA Polymeraseuntereinheit (Rpa34)	S187	<i>S.cerevisiae</i>
KIHDppTSDDMAINGLER	+	Anorganische Phosphattransporter (Pho84)	T302	<i>S.cerevisiae</i>
VVDFGSATYDDEHHSTLVppSTR	++	Dual spezifische Proteinkinase (CLK1)	S341	HEK 293
YppSGAYGASVSDEELK	++	MICOS Komplex Untereinheit (MIC19)	S50	HEK 293
KPATPAEDDEDDDEDLFGppSD-NEEDKEAAQLR	++	Elongationfaktor 1-delta (EEF1D)	S162	HEK 293
CGSGPVHISGQHLVAVE-EDAEppSEDEEEEDVK	++	Nukleophosmin (Npm1)	S125	HEK 293
ESEDKPEIEDVGppSDEEEEEK-KDGDK	++	Heatshockprotein HSP 90-alpha (HSP90A)	S63	HEK 293
VMLGEppTNPADSKPGTIR	++	Nukleosiddisphosphatkinase A (NME1)	T94	HEK 293
TDHGAEIVYKppSPVVSGDpTSPR	+	Mikrotubuli-assoziiertes Protein Tau (MAPT)	S713	HEK 293
NEEPppSEEEIDAPKPK	++	Nucleolar RNA Helikase 2 (DDX21)	S121	HEK 293
IDASKNEEDEGHNSppSSPR	++	Heterogenes Nuclearribonucleoprotein D0 (HNRNPD)	S82	HEK 293
IDASKNEEDEGHNSppSPR	++	Heterogenes Nuclearribonucleoprotein D0 (HNRNPD)	S83	HEK 293
KGAGDGppSDEEVDGKADGAEA KPAE	++	Myosin- 9 (MYH9)	S1943	HEK 293
SIppSADDDLQESSR	++	Negativer Elongationsfaktor E (NELFE)	S115	HEK 293
FQppSEEQQTEDELQDK	++	β-Casein (CSN2)	S35	<i>Bos taurus</i>

*Pyrophosphopeptide, welche mit einer Konfidenz von ++ deklariert sind, wurden eindeutig nachgewiesen. Bei Peptiden mit einer Konfidenz von + liegt eine Pyrophosphorylierung mit hoher Wahrscheinlichkeit vor.

Aufgrund der relativ geringen relativen Abundanzen der Precursorionen der pyrophosphorylierten Peptide (vgl. Kapitel 3.6.9) gelang in den non-Targetproteomikansätzen bislang nur der reproduzierbare Nachweis der Pyrophosphorylierung von CLK1. Alle weiteren Pyrophosphorylierungen wurden ein- bzw. zweimal identifiziert. CLK1 ist in der Lage Serin, Threonin und Tyrosinreste zu phosphorylieren. Außerdem wird es in Verbindung mit Splicing von pre-mRNA gebracht.^{313, 314}

Mit NME1 wurde eine weitere Kinase identifiziert. Sie weist substratspezifität für Serin, Threonin und Histidin auf und agiert als Geranyl- und Farnesylpyrophosphatkinase. In dessen Folge ist sie unter anderem in Zellproliferation, Differenzierung und Entwicklung, Signalübertragung und Genexpression involviert.^{315, 316}

CHCHD3 ist ein Bestandteil des MICOS-Komplexe, ein großer Komplex der inneren Mitochondrienmembran, welcher essentiell für die strukturellen Integrität der inneren Membran, der Ausprägung von Kontaktstellen zur äußeren Membran und den Erhalt der Cristaefunktion ist. Außerdem fungiert CHCHD3 durch Bindung an den BAG1-Promoter als Transkriptionsfaktor.^{317, 318}

Strukturgebende Eigenschaften sind ebenfalls für MYH9 bekannt, das eine wichtige Rolle bei der Reorganisation des Zytoskeletts einnimmt. Darüber hinaus sind weitere Funktionen wie die Secretion und das Capping bekannt.³¹⁹

Ferner wurden verschiedene Proteine identifiziert, welche an verschiedenen Stellen in die Transkription eingreifen. Beispielweise agiert die Nucleolare RNA Helikase 2 (DDX21) als ein Sensor für den Transkriptionsstatus der RNA-Polymerase I & II. Die Helikase bindet an verschiedene RNA-Moleküle, unterstützt das Prozessierung von ribosomaler RNA und die Transkription von Polymerase II.³²⁰

Ebenfalls an RNA-Moleküle bindet HNRNPD. Das an zwei benachbarten Positionen pyrophosphorylierte Protein hat eine besondere hohe Affinität für AU-reiche Sequenzabschnitte, welche in zahlreichen proto-Onkogenen und zytokiner mRNA gefunden wurden.²⁹⁴⁻²⁹⁶

Elongationsfaktor 1-delta ist eine Untereinheit des Elongationsfaktor-1-komplexes und stimuliert den Transfer von Aminoacyl-tRNA zum Ribosomen.³²¹

NELFE ist ein wichtiger Bestandteil des NELF-Komplexes, für den eine negative Regulation der Elongation der Transkription von RNA-Polymerase II beschrieben ist.^{322, 323}

Mit HSP90AA1 findet sich ein weiteres äußerst wichtiges Protein unter den pyrophosphorylierten Proteinen. Als molekulares Chaperon zeigt es sich für ein breites Spektrum an Aufgaben verantwortlich, darunter die Maturation, die Aufrechterhaltung der Struktur und Regulation spezifischer Proteine, welche z. B. in die Kontrolle des Zellzyklus oder in Signalwegen involviert sind. Es durchläuft einen ATPase-Aktivität abhängigen, funktionellen Zyklus, der in Verbindung mit der Chaperonaktivität steht. Dieser Zyklus bewirkt womöglich strukturelle Veränderungen in den Zielproteinen, wodurch deren Aktivität beeinflusst wird.³²⁴⁻³²⁶

Das an Position Ser-125 pyrophosphorylierte Protein Nucleophosmin ist unter anderem in die Ribosombiogenese eingebunden. Dies ist von gesteigertem Interesse, da bereits die für die Pyrophosphorylierung relevanten Inositolpyrophosphatmessengermoleküle in Verbindung mit der Synthese von Ribosomen stehen.⁴⁸ Vermutlich bindet es an Ribosomen um somit deren Transport aus dem Zellkern zu bewirken.³²⁷ Des Weiteren ist NPM1 an der Centrosomduplikation, dem Proteinchaperoning, dem Aufbau von Histonen, der Zellproliferation und der Regulation der Tumorsuppressoren p53/TP53 und ARF beteiligt.³²⁸⁻³³⁰ Assoziiert mit nucleolaren Proteinstrukturen bindet es an einzelsträngige Nucleinsäuren. Außerdem fungiert es als Chaperonin für die Kernhistone H3, H2B und H4.³³¹

Die aufgeführten endogenen, pyrophosphorylierten Proteine sind für eine Vielzahl essentieller, zellulärer Prozesse verantwortlich. Inwieweit die Modifikation dieser Prozesse beeinflusst und ob demzufolge eine biologische Funktion von der Pyrophosphorylierung ausgeht lässt sich bis dato nicht abschließend klären. Dazu sind weiterführende Experimente bei denen unter anderem Quantifizierungen der Modifikationsstellen erfolgen müssen, angezeigt. Basis dessen ist ein robuster *bottom-up*-Phosphoproteomikansatz, welcher die zuverlässige Identifizierung und Quantifizierung der pyrophosphorylierten Peptide erlaubt.

4 Zusammenfassung und Ausblick

Die Proteinphosphorylierung ist eine posttranslationale Modifikation, die ein breites Spektrum an zellulären Prozessen beeinflusst. Sie fungiert als ein schnelles, reversibles Werkzeug zur Modulation der Struktur und Aktivität von Proteinen. Ihre Regulation ist ein zentraler Mechanismus bei der Kontrolle von Zelltod und Krankheit. Diese fundamentale Bedeutung hat die Entwicklung selektiver Anreicherungsverfahren, effizienter chromatographischer Trenntechniken, zuverlässiger Quantifizierungsmethoden, potenter bioinformatischer Algorithmen und nicht zuletzt immer leistungsfähigerer massenspektrometrischer Methoden vorangetrieben und ein eigenes Forschungsgebiet - die Phosphoproteomik begründet. Die überwiegende Mehrheit an Studien konzentriert sich dabei auf Phosphorylierungen von Ser, Thr und Tyr. In der näheren Vergangenheit sind jedoch labilere Phosphorylierungen von Arg, Cys, His und Lys sowie Pyrophosphorylierungen von Ser und Thr verstärkt in den Fokus der Wissenschaft gerückt. Aufgrund ihrer inhärenten Labilität gegenüber niedrigen und zum Teil hohen pH-Werten, erhöhten Temperaturen und tandemmassenspektrometrischen Verfahren sind sie nur unzureichend mit herkömmlichen phosphoproteomischen Ansätzen zugänglich.

Im Zuge dieser Arbeit wurden erfolgreich verschiedene massenspektrometrische Methoden zur Analyse labiler Phosphorylierungen entwickelt. Kernstück dieser Verfahren war die EThcD-Fragmentierung. Sie ermöglichte im Gegensatz zu den weitverbreiteten kollisionsbasierten Fragmentierungstechniken CID und HCD die Fragmentierung labil modifizierter Peptide ohne Verlust der Modifikation bei verbesserter Sequenzabdeckung. Ihre adäquate Applikation in verschiedenen *bottom-up*-proteomischen Fragestellungen führte zur zweifelsfreien Identifikation endogener Cysteinphosphorylierungen und-sulfatierungen. Entgegen den herkömmlichen elektronenbasierten Fragmentierungstechniken (ETD & ECD) ohne zusätzliche Aktivierung ermöglichte EThcD die effiziente Fragmentierung häufig auftretender, doppelt protonierter Peptide. Dieses Alleinstellungsmerkmal gegenüber den gebräuchlichen Tandem-MS-Techniken wurde anhand verschiedener, labil phosphorylierter Peptide und umfangreicher bioinformatischer Analysen dokumentiert. Mit diesen Ergebnissen wurde eine wesentliche Lücke bei der ungezielten Suche nach labilen Phosphorylierungen geschlossen und ein entscheidender Beitrag für die zukünftige Identifizierung neuer endogener Phosphorylierungen geleistet.

Des Weiteren war die EThcD in Kombination mit anderen Fragmentierungstechniken ein essentieller Bestandteil bei der Charakterisierung synthetisch eingeführter PTMs, wie der Proteinpyrophosphorylierung oder der Cysteinphosphorylierung. Die entwickelten Methoden waren zum einen für die Dokumentation der korrekten Position der implementierten Proteinmodifikation von Bedeutung und erlaubten zum anderen die Beobachtung von Nebenprodukten. Perspektivisch können die aufwendig validierten Syntheseansätze dazu genutzt werden, um noch effizientere Anreicherungsverfahren zu entwickeln, die biologische Funktion einer bestimmten Phosphorylierungsstelle zu untersuchen oder mögliche Interaktionspartner zu identifizieren.

Ferner gelang es mit den entwickelten Methoden artifizielle Modifikationen von Phosphoramidaten an Antikörpern sicher zu lokalisieren und die hohe Selektivität des Syntheseansatzes gegenüber den Thiolgruppen des Cysteins herauszustreichen. Es wurde gezeigt, dass mit der entwickelten Synthese explizit die Cysteinreste der Interketten-Disulfidbrücken adressiert werden und die Intraketten-Disulfidbrücken der Untereinheiten (leichte & schwere Kette) unangetastet bleiben. In den jeweiligen *bottom-up*-Ansätzen wurde eine herausragende Sequenzabdeckung für die leichte Kette und eine sehr gute Sequenzabdeckung für die schwere Kette erzielt. Bestünde in der Zukunft ein gesteigertes Interesse an einer detaillierteren Charakterisierung der schweren Kette, so sei die Verwendung einer unspezifischen Protease oder einer Mischung aus verschiedenen Enzymen angezeigt.

Eigens für die Messung intakter Antikörper-Wirkstoff-Konjugatuntereinheiten wurden verschiedene LC-MS-Methoden entwickelt, welche detaillierte Informationen über die Anzahl an gebundenen Modifikationen pro Untereinheit und das Antikörper-Wirkstoff-Verhältnis lieferten. Die auf Orbitrap- und TOF-basierten Analysen gewährleisteten eine zuverlässige und empfindliche Detektion der modifizierten Antikörperuntereinheiten. Darüber hinaus wurden optimale Bedingungen für die *top-down*-Fragmentierung kleiner bis mittelgroßer Proteine erarbeitet und deren Potential und Grenzen bei der Charakterisierung von Proteinmodifikationen diskutiert.

Für die Charakterisierung der ersten endogenen Lysinphosphorylierung wurden auf diversen Gebieten wichtige Grundlagen gelegt. So wurde gezeigt, dass sich lysinphosphorylierte Peptide des Histon H1, eines der bedeutendsten Protein-Targets, effizient derivatisieren und ihre problematischen chromatographischen und massenspektrometrischen Eigenschaften zweckdienlich verändern lassen. Die vorgenommene Propionylierung modifizierte freie Lysinreste unter Erhalt labiler Lysinphosphorylierungen, ermöglichte einen Pseudo-ArgC-Verdau mit Trypsin und bildet die Basis für konzentrierte Studien des N-Terminus des Histon H1. Die auf diesem Weg generierten, multipel modifizierten Peptide, lassen sich sicher mittels EThcD bestimmen. Zusätzlich werden potentielle Migrationen des Phosphatrestes zu anderen Akzeptoren zuverlässig unterbunden. Einzig die effektive Anreicherung der Histone stellt bislang eine große Herausforderung dar. Die Weiterentwicklung der bestehenden WCX-Fraktionierung oder alternativ die Verwendung eines Affinitäts-Pull-down-Experiments sind mögliche nächste Schritte zur Identifizierung der ersten pLys-Position auf dem Histon H1.

Unabhängig davon wurde ein kompletter *bottom-up*-Ansatz für die Analyse labiler Phosphorylierung implementiert. Er besteht aus einer äußerst effizienten IMAC-basierten Anreicherung und einer leistungsfähigen RPLC-Fraktionierungstechnik. Diese nutzt einen pH-Wert von acht und minimiert somit die Hydrolyse säurelabiler Phosphorylierungen. Aufgrund der größeren chromatographischen Orthogonalität gegenüber der RPLC-MS übertraf die basische Fraktionierung die Leistungsfähigkeit eines bestehenden, auf saurer RP-HPLC-Fraktionierung basierenden 2D-RPLC-RPLC-MS-Ansatzes. Der letzte Schritt des Arbeitsablaufes stellt eine hochselektive datenabhängige MS-Methode dar. Diese basiert auf der Erkennung pLys-spezifischer Phosphoimmoniumionen (m/z 164,047 & 181,074) unter HCD-Bedingungen und der anschließenden Aufzeichnung eines zusätzlichen EThcD-Spektrums des

gleichen Precursorions. Diese Strategie garantiert eine zuverlässige Identifizierung von lysinphosphorylierten Peptiden ohne Kompromisse in Bezug auf Schnelligkeit und Empfindlichkeit eingehen zu müssen. Die Identifizierung endogener Arginin-, Aspartat- und Histidinphosphorylierungen sind ein klares Indiz für das Potential des entwickelten Workflows. Der Nachweis der ersten endogenen Lysinphosphorylierung, einer PTM deren Existenz bis heute nicht abschließend geklärt ist, gelang mit dieser Methodik jedoch nicht. Umso bedeutsamer ist es, dass weitere Experimente mit zugesetzten pLys-Peptiden in repräsentativen Konzentrationen durchgeführt werden. Nur unter der Prämisse, dass diese Peptide den gesamten Ablauf ohne eine vorzeitige Hydrolyse der Phosphorylierung passieren, lassen sich fundierte Aussagen über die Existenz der Lysinphosphorylierung in dem jeweiligen Proteom treffen.

Zuletzt wurde gezeigt, dass sich isobare pyro- und diphosphorylierte Peptide anhand ihres Neutralverlustmusters unterscheiden. Unter optimalen CID-Bedingungen weisen pyrophosphorylierte Peptide einen zusätzlichen Neutralverlust von 178 Da auf. Dieses diagnostische Fragmentation wurde in einer neutralverlustgetriggerten EThcD-Methode genutzt, um EThcD selektiv für die Identifizierung von pyrophosphorylierten Peptiden einzusetzen. Das Verfahren erlaubt eine schnelle und äußerst empfindliche Detektion von pyrophosphorylierten Peptiden. Zusammen mit verschiedenen Anreicherungs- und Fraktionierungstechniken wurden damit in Hefe- und humanen embryonalen Nierenzellen die ersten Proteinpyrophosphorylierungen, eine neue endogene PTM, zweifelsfrei nachgewiesen. Die identifizierten pyrophosphorylierten Peptide waren ausschließlich niedrig abundant. Ziel in der Zukunft muss es daher sein, eine noch selektivere Anreicherung der pyrophosphorylierten Peptide und eine verbesserte Abtrennung von monophosphorylierten Peptiden zu erreichen. Eine mögliche Alternative könnte die sequentielle IMAC-Anreicherung (SIMAC) in Kombination mit basischer RPLC-Fraktionierung darstellen.¹¹² Die entwickelte Triggermethode lotet die derzeit bestehenden technologischen Grenzen des Massenspektrometers in Bezug auf Schnelligkeit, Empfindlichkeit und Dynamikbereich aus und lässt wenig Raum für signifikante Verbesserungen.

Mit der Entdeckung einer neuen endogenen PTM drängt sich zwingend die Frage nach deren biologischer Bedeutung auf. Anhand einer größeren Anzahl an identifizierten Positionen und mit Hilfe etablierter Quantifizierungsmethoden (wie SILAC) gilt es diese zukünftig zu beleuchten.

Des Weiteren traten im Zuge dieser Arbeit verschiedene technologische Grenzen auf, die es zukünftig zu verschieben gilt. So ist beispielsweise der dynamische Bereich der Orbitrapzelle ein wesentlicher limitierender Faktor bei der Erkennung von Isotopenmustern im MS¹. Der Einsatz von TOF-Analysatoren mit vergleichbar hohen Auflösungen könnte eine sinnvolle Alternative darstellen. Ein verbesserter Algorithmus hat zwar zu einer höheren Anzahl an erkannten Isotopenmustern und demzufolge mehr getriggerten MS² geführt, trotzdem bleibt ein wesentlicher Teil der im MS¹ auftretenden Signale nicht zugeordnet und die große MS²-Kapazität moderner Massenspektrometer ungenutzt.³¹²

Das PASEF-Experiment hat gezeigt, dass eine beinahe lückenlose Nutzung der Zykluszeit in Kombination mit hochauflösender Detektion bemerkenswerte Ergebnisse auf dem Gebiet der Proteomik er-

möglich.⁹⁹ Inwieweit sich eine vergleichbare Ionenmobilitätstrennung mit einer Detektion in der Orbitrapzelle kombinieren lässt, bleibt fraglich. Entsprechende IMS-Zellen, welche sich mit Orbitrapgeräten koppeln lassen, sind bereits kommerziell erhältlich, konnten sich jedoch bislang nicht in der Phosphoproteomik etablieren. Die ausführlich diskutierte, doppelt dynamische Abstimmung von Auflösung und Injektionszeit in datenabhängigen high-high-Aufzeichnungsmethoden sollte jedoch bereits jetzt technologisch realisierbar sein. Diese würde nicht nur eine optimale Nutzung der Zykluszeit gewährleisten, sondern auch die Geschwindigkeit und Empfindlichkeit des DDA-Experiments erhöhen.

Eine erheblich kostspieligere Alternative wäre der Einbau eines weiteren hochauflösenden Massenspektrometers mit kürzeren Scanzeiten (z.B. TOF-MS), sodass parallel zur Aufzeichnung des MS¹ in der Orbitrap mit hoher Geschwindigkeit MS²-Spektren im TOF-Analysator detektiert werden.

ETHcD hat das Potential sich langfristig als führende Tandem-MS-Technik der Phosphoproteomik zu etablieren. Dies gelingt jedoch nur, wenn erhebliche Fortschritte bei der Reduktion der Zykluszeit erzielt werden. Diesen scheinen jedoch physikalische Grenzen gesetzt. Außerdem bedarf es für ETHcD eines immensen apparativen Aufwandes, der eine Ionenfalle, eine HCD-Zelle und eine hochauflösende Detektion umfasst. Eine kürzlich von der Gruppe von Albert Heck auf der ASMS vorgestellte Technik kombiniert die ECD mit der HCD (EChcD) und hat bereits vergleichbare Ergebnisse wie ETHcD erzielt.³³² Die Technik verzichtet auf die Ionenfalle für den ETD-Prozess und baut auf der simpleren, kompakteren und kostengünstigeren Plattform der Q-Exactive™-Geräte auf.

Neben der Datengenerierung müssen Fortschritte auf dem Gebiet der Datenauswertung vollzogen werden. Vor allen Dingen bedarf es einer umfassenden und unabhängigen Evaluierung bestehender Suchalgorithmen. Verschiedene etablierte Suchmaschinen weisen eklatante Defizite bei der korrekten Lokalisierung von Modifikationen auf. Nur ein offener Diskurs dieser Limitierungen wird langfristig zu verlässlicheren Ergebnissen und einer eindeutigen Identifizierung labiler Phosphorylierungen führen. Damit einhergehend gilt es sich auf international geltende Standards bei der Datenauswertung zu einigen. Nur so ist eine ausreichende Vergleichbarkeit zwischen unterschiedlichen Phosphoproteomstudien gegeben. Ist dies nicht realisierbar, sollte das Publizieren von Ergebnissen grundsätzlich und verpflichtend mit der Gewährung des Zugangs zu den entsprechenden Rohdaten verknüpft sein.

Gelingt es in der Zukunft die verbliebenen spezifischen und allgemeinen Herausforderungen bei der Analyse labiler Phosphorylierungen zu meistern, so ist die Basis für ein tieferes Verständnis der biologischen Rolle dieser bislang kaum untersuchten PTMs gegeben. Welcher eminenten Bedeutung die Überwindung dieser Limitierungen zukommt, zeigt eine kürzlich erschienene Arbeit in der ein Zusammenhang zwischen Histidinphosphorylierungen und der Tumorgenese aufgezeigt wird.¹⁹ Ob die Pyrophosphorylierung, die Cysteinphosphorylierung oder möglicherweise die Lysinphosphorylierung eine vergleichbar essentielle Bedeutung einnehmen, lässt sich bislang noch nicht beurteilen. Die massenspektrometrischen Methoden zur Charakterisierung dieser labilen Modifizierungen stehen hiermit allerdings zur Verfügung.

5 Material und Methoden

5.1 Material

Für die massenspektrometrische Analyse wurden Lösungsmittel in LC-MS Qualität (0,1% Ameisensäure und 0,1% Ameisensäure in Acetonitril) von Biosolve (Valkenswaard, Niederlande) bezogen. Für die Peptidsynthese wurden Dichlormethan (DCM, Reagent Grade), *N,N*-Dimethylformamid (DMF, Reagent Plus), *N,N*-Dimethylacetamid (DMA, Reagent Plus®), *N,N*-Diisopropylethylamin (DIPEA, Reagent Grade), und Acetonitril (HPLC Grade) von Sigma Aldrich (Allentown, USA) verwandt. Trifluoressigsäure (TFA) stammte von Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA). Aminosäurebausteine, Festphasenharze, Kupplungs- und Aktivierungsreagenzien wurden von Anaspec (Fremont, USA) bezogen.

Alle Puffer und Lösungen wurden mit deionisiertem Wasser hergestellt. Laufmittel für die HPLC wurden zusätzlich durch einen Membranfilter mit einer Poorengröße von 0,2 µm filtriert.

5.2 Tandemmassenspektrometrie labil phosphorylierter Peptide

5.2.1 Synthese labil phosphorylierter Peptide

Die Peptidsynthese wurde mit Hilfe eines Syro II™ Peptidsynthesizers (MultiSynTech, Witten) durchgeführt. An der gewünschten Phosphorylierungsstelle wurde der geschützte Aminosäurebuildingblock (für Phosphoargininpeptide) oder ein Precursor (His für pHis, Cys für pCys & Azido-Lys für pLys) eingeführt. Phosphohistidinpeptide wurden durch Inkubation von Histidinpeptiden mit Kaliumphosphoramidat nach dem Protokoll von Wei und Matthews erhalten.⁶³ Freie Phosphoargininpeptide wurden durch Hydrogenierung mit bis(2,2,2-trichloroethyl) phosphoramidat synthetisiert.⁶⁸ Phosphocysteinpeptide wurde in einer dreistufigen Synthese, welche sich aus der Aktivierung von Cysteinpeptiden mit Ellman's Reagenz, der Reaktion mit einem photospaltbaren Phosphit und der abschließenden Freisetzung durch Bestrahlung, gewonnen.⁶¹ Für die Synthese von Phospholysinpeptiden wurden Azido-Lysinpeptide mit einem photospaltbaren Phosphit umgesetzt und anschließend bestrahlt.⁶⁰ Pyrophosphorylierte Peptide wurden durch Umsatz von serin- und threoninphosphorylierten Peptidprecursoren mit Phosphoramidazoliden und anschließender Hydrogenierung freigesetzt.⁷⁴

5.2.2 ETD-, HCD- und EThcD-Experimente

Synthetische pArg-, pCys-, pHis- und pLys-Peptide sowie pyrophosphorylierte Peptide von Serin und Threonin wurden im deionisierten Wasser aufgenommen und auf eine Konzentration von ca. 5 pmol/ μ L verdünnt. Anschließend erfolgte die Analyse der Peptide mit einem RP-kapillarchromatographischen System (Dionex Ultimate™ 3000 NCS-3500RS Nano, Thermo Scientific) gekoppelt mit einem Orbitrap Fusion™ Tribrid Massenspektrometer (Thermo Fisher Scientific). Die Steuerung des Systems erfolgte über die Software Xcalibur™ Version 3.0 und Chromeleon™ Xpress Version 2.14. Die Peptide wurden auf eine PepMap C18-Vorsäule (5 μ m, 100 Å, 5 mm x 300 μ m, Thermo Fisher Scientific) geladen und durch Spülen mit 2% Eluent A entsalzt sowie aufkonzentriert. Die Eluenten im Ladekanal setzten sich aus den Komponenten A (0,1% TFA in Wasser) und B (0,1% TFA in ACN) zusammen und wurden mit einer Flussrate von 300 μ L/min für 25 min über die Vorsäule gepumpt. Danach wurde die Vorsäule in den analytischen Strom geschaltet und die Peptide mittels NanoLC getrennt. Die chromatographische Trennung erfolgte mit einer selbst gepackten PicoTip-Säule, welche einen Innendurchmesser von 75 μ m und eine Länge von 25 cm besaß. Gepackt war die Trennsäule mit ReproSil-Pur C18AQ Partikeln (3 μ m, 120 Å, Dr. Maisch, Ammerbuch). Als Laufmittel kamen die Komponente A mit 0,1% Ameisensäure in Wasser und die Komponente B mit 0,1% Ameisensäure in Acetonitril zum Einsatz. Für die Trennung der Peptide wurde Komponente B innerhalb von 40 min auf 30% erhöht. Die Ionisierung erfolgte im positiven Modus bei einer Elektrosprayspannung von 2,1 kV. Die entstandenen Precursorionen wurden bei einer Ionentransfertemperatur von 275 °C in das Massenspektrometer geleitet. Massenspektren wurden im DDA-Aufnahmemodus aufgezeichnet. FTMS-Übersichtsspektren wurden für den Massenbereich von 300 bis 1400 m/z bei einem Auflösungsvermögen von 120.000 (FWHM) unter Verwendung der EASY-IC-Funktion aufgezeichnet. Um den AGC-Targetwert von 1×10^5 zu erreichen, wurde eine maximale Injektionszeit von 50 ms angewendet. Für die Betrachtung der doppelt geladenen labil phosphorylierten wurde sich ausschließlich auf diese Spezies konzentriert, wobei das monoisotopische Precursorion selektiert wurde. Die Vorläuferionen wurden mit Hilfe eines massenselektiven Quadrupols innerhalb eines Isolationsfensters von m/z 1,6 isoliert. Als dynamische Ausschlusszeit wurden 5 s eingesetzt. Alle EThcD-Spektren wurden mit einem Auflösungsvermögen von $R=15.000$ und der internen Kalibrierung EASY-IC als profile Daten aufgezeichnet. Um sicherzustellen, dass die erzielten Ergebnisse alleinig von den Fragmentierungsbedingungen abhängig waren, wurde eine maximale Injektionszeit von 1000 ms und ausschließlich Scanevents, welche die maximale Injektionszeit nicht erreicht hatten, verwandt. Für die EThcD-Fragmentierung wurden bei einem AGC-Targetwert von $5e4$, kalibrierte, ladungsabhängige ETD-Parameter gewählt und die zusätzliche normalisierte HCD-Aktivierung (sa) variiert. Die zusätzliche Fragmentierung der ETD-Produkte erfolgte mit 20, 25, 30, 40 & 50% NCE. Außerdem wurden bei einer konstanten zusätzlichen Aktivierung von 30% und einem AGC-Targetwert von $5e4$ unterschiedliche ETD-Reaktionszeiten von 75, 100, 125 und 150 ms erprobt. Zuletzt wurden bei 100 ms ETD-Reaktionszeit und einer zusätzlichen normalisierten Aktivierung von

30% die AGC-Targetwerte variiert und Spektren mit 3×10^4 , 4×10^4 , 5×10^4 und 1×10^5 Ionen aufgezeichnet. CID und HCD MS/MS Spektren wurden mit verschiedenen NCEs zwischen 25% und 35%, einem Auflösungsvermögen von 15.000 und einem AGC-Targetwert von $5e4$ aufgezeichnet.

5.2.3 Datenbankgestützte Analyse der doppelt geladener, labilphosphorylierter Peptide

Die erzeugten Daten wurden mit dem Programm Proteome Discoverer Version 2.1 (Thermo Fisher Scientific) ausgewertet. Als Suchalgorithmus wurde Sequest HT verwendet. Der Nichtfragmentationenfilter wurde mit folgenden Kriterien eingesetzt: Precursorionen und ladungsreduzierte Precursorionen wurden innerhalb eines Massenfensters von ± 2 Da und Signale, die aus Neutralverlusten resultierten, innerhalb eines Fensters von ± 0.5 Da von der Evaluierung ausgeschlossen. Die MS/MS-Spektren wurden gegen eine Datenbank gesucht, welche die Sequenzen der synthetischen Phosphopeptide enthielt. Die Precursormassentoleranz wurde auf 10 ppm beschränkt und ein Fragmentmassenfehler von 0,02 Da zugelassen. Phosphorylierungen (S, T, Y, C, K, H & R), Pyrophosphorylierungen (S & T) und Amidierungen des C-Terminus wurden als variable Modifikationen gesucht. Der Target Decoy PSM Validator wurde verwandt um PSMs mit einer FDR < 0.01 zu filtern. Die Lokalisierung der Phosphorylierungsstelle erfolgte mit dem Algorithmus *ptmRS* unter der Berücksichtigung diagnostischer Ionen.⁸⁵ Für die Untersuchung der einzelnen Fragmentierungsbedingungen wurden die drei technischen Replikate in einer Suche zusammengefasst. Die Identifizierungsrate für die einzelnen Bedingungen wurde aus dem Quotient der Anzahl an identifizierten Spektren und der gesamten Anzahl an aufgezeichneten Spektren ermittelt.

5.3 Charakterisierung einer endogenen Cysteinphosphorylierung

5.3.1 Bottom-up-In-Gelverdauansatz

Nach der *in vitro* Phosphorylierung mit PEP wurde das Zelllysate mittels SDS-PAGE Gelelektrophorese aufgetrennt. Eine Gelbande mit einer Masse von ca. 10 kDa wurde ausgeschnitten und ein Standard In-Gelverdau vorgenommen.³³³ Danach wurden die Proben in 1% Acetonitrillösung aufgenommen und mittels nanoLC-MS/MS analysiert.

5.3.2 Bottom-up-2D-LC-MS-Ansatz mit Lösungsverdau

Im Anschluss an die *in vitro* Phosphorylierung mit PEP wurde das Zelllysate mit 20 μ g Trypsin (sequencing, grade (Madison, USA)) über Nacht verdaut. Das Hydrolysat wurde danach mittels RPLC

fraktioniert. Als stationäre Phase kam eine Acclaim™ Pep Map 100 C₁₈ Säule (1,0 mm x 250 mm x 5 µm) bei einer Flussrate von 40 µL/min und einem linearen Gradient bei dem die Komponente B binnen 80 min von 1 auf 50% erhöht wurde, zum Einsatz. Komponente A der mobilen Phase beinhaltete 0,1% TFA und 5% ACN in Wasser. Und Komponente B bestand aus 0,1% TFA und 80% ACN in Wasser. Der Eluent wurde pro Fraktion für 65 s aufgefangen und die gesammelten Fraktionen durch poolen zu einer Gesamtanzahl von 16 Fraktionen vereinigt. Die Proben unter Vakuum eingeeengt und in 6 µL 1%iger ACN-Lösung für die nanoLC-MS-Messung aufgenommen.

5.3.3 Targeted Tandem-MS-Ansatz

Für die nanoLC-MS-Analyse stand das in Kapitel 5.2.2 beschriebene System zur Verfügung. Die chromatographische Trennung erfolgte mit Hilfe einer Flussrate von und eines linearen Gradientens bei dem die Komponente B innerhalb von 60 min von 1% auf 50% erhöht wurde. Hochaufgelöste Übersichtsspektren wurden mit einem Auflösungsvermögen von 60.000, bei einem AGC-Targetwert von $1e^5$ und einer maximalen Injektionszeit von 50 ms aufgezeichnet. Im DDA-Modus wurden monoisotopische Precursorionen einer Auswahlliste mit Ladungszuständen von zwei und drei mit einem massenselektiven Quadrupol für die Fragmentierung ausgewählt, wobei der höhere Ladungszustand bevorzugt wurde. FTMS² Spektren wurden mit einem Auflösungsvermögen von 15.000, einem Targetwert von 1×10^5 und einer maximalen Injektionszeit von 200 ms gemessen. EThcD-Spektren wurden mit kalibrierten ladungsabhängigen ETD-Parametern zusätzlichen HCD-Aktivierungsenergien von 10%, 20% und 30% aufgezeichnet. Für HCD wurde eine NCE von 30% gewählt. Die erzeugten MS/MS-Spektren wurden manuell verifiziert und dabei alle möglichen Phosphorylierungsstellen einbezogen.

5.4 Charakterisierung von Proteinmodifikationen

5.4.1 Charakterisierung einer pyrophosphorylierten Myoglobinmutante

5.4.1.1 LC-MS Messung des intakten Proteins

Die intakten, modifizierten Proteine wurden mit einem RP-UPLC System Acquity™ H class (Waters) gekoppelt mit einem Xevo™ G2-XS-Q-TOF Massenspektrometer (Waters) analysiert. Für die chromatographische Trennung stand eine Acquity™ UPLC Protein BEH C₄ Säule (300 Å, 1,7 µm, 2,1 mm x 50 mm) zur Verfügung, welche im Säulenofen bei 60°C gehalten wurde. Die mobile Phase setzte sich aus der Komponente A (0,1% Ameisensäure in H₂O) und Komponente B (0,1% Ameisensäure in ACN) zusammen. Die Trennung erfolgte innerhalb von 6 min mittels eines linearen Gradienten begin-

nend bei 5% und endend bei 95% von Komponente B. Die Proteine wurden im positiven Modus bei einer Sprayspannung von 4 kV ionisiert. Unterstützt wurde der Ionisierungsprozess mit einem Desolvationsgasfluss von 400 l/min und einer Quelltemperatur von 100°C. Die Daten wurden im sensitiven Modus mit einem Auflösungsvermögen von $R=20.000$ aufgezeichnet. Zur Erhöhung der Massengenauigkeit wurde Leucinenkephalin (m/z 556,2771, $[M+H]^+$) als Lockmasse in regelmäßigen Abständen dem Ionenstrom zugeführt. Die erzeugten Rohdaten wurden mit dem MaxEnd1™ Algorithmus deconvolviert.

5.4.1.2 Bottom-up-Proteomikansatz

Das enzymatische verdaute Protein wurde in Wasser aufgenommen und mit dem in Kapitel 5.2.2 beschriebenen nanoLC-MS-System analysiert. Die chromatographische Trennung erfolgte bei einer Flussrate von 300 nL/min wobei die Komponente B innerhalb von 45 min von 2 auf 50% erhöht wurde. Die Komponente A setzte sich aus 0,1% Ameisensäure zusammen und Komponente B bestand aus 0,1% FA und ACN. FT-Übersichtsspektren wurden in einem Bereich von m/z 350 bis 1500 mit einem Auflösungsvermögen von 120.000 und einem AGC-Targetwert von 2×10^5 aufgezeichnet. Precursorionen mit Ladungszuständen zwischen 2+ und 4+ wurden mit einem massenselektiven Quadrupol innerhalb eines Isolationsfensters m/z 1,6 isoliert und einer EThcD-Fragmentierung unterzogen. Als dynamische Ausschlusszeit wurden 30 s festgelegt und die maximale Injektionszeit zum Erreichen des Targetwertes von 1×10^5 auf 1 Sekunde begrenzt. Die ETHCD-Spektren wurden mit einem Auflösungsvermögen von $R=15.000$ aufgezeichnet. Für den ETD-Prozess wurden ladungsabhängige ETD-Parameter verwendet und die zusätzliche Aktivierungsenergie (sa) auf 50% für doppelt geladene und 20% für höher geladene Precursorionen festgelegt.

5.4.2 Charakterisierung einer cysteinphosphorylierten Angiogeninmutante

5.4.2.1 LC-MS Messung des intakten Proteins

Reaktionsprodukte der positionsspezifischen Cysteinphosphorylierung von Angiogenin S87C wurden mit Hilfe des in Kapitel 5.4.1.1 vorgestellten UPLC-MS-QTOF-Systems analysiert. Die chromatographische Trennung erfolgte mit einer Acquity™ UPLC Protein BEH C₄ Säule (300 Å, 1,7 µm, 2,1 mm x 50 mm). Eluent A setzte sich aus 0,05% FA in Wasser und Eluent B aus 0,05% FA in ACN zusammen. Die Trennung erfolgte binnen 6 min bei 60 °C unter Anwendung eines linearen Gradients, bei dem der Anteil an Eluent B von 5 auf 95% erhöht wurde. Für die Ionisierung wurde eine Sprayspannung von 4 kV angelegt, ein Desolvationsgasfluss von 400 L*min⁻¹ verwendet und die Ionenquelle

auf 100 °C erwärmt. Die Daten wurden im sensitiven (linearen) Modus ($R=20.000$ (FWHM)) aufgezeichnet. Als interner Kalibrant wurde Leucinenkephalin in regelmäßigen Abständen dem Gasfluss hinzugeführt. Die erzeugten Rohdaten wurden mit dem MaxEnt1™ Algorithmus dekonvolviert.

5.4.2.2 *Bottom-up-Ansatz*

Nach dem Lösungsverdau der Proteine wurden die Peptide in Wasser aufgenommen und mit dem in Kapitel 5.2.2 beschriebenen nanoLC-MS/MS System analysiert. Die chromatographische Trennung wurde mit selbstgepackten C_{18} Säulen (Säulenmaterial: Poroshell™ 120 EC-C18, 2,7 μm (Agilent Technologies)) bei einer Flussrate von 280 nL/min durchgeführt. Das Laufmittel A setzte sich aus 0,1% FA und Wasser, Laufmittel B aus 0,1% FA in ACN zusammen. Während der Gradientelution wurde die Komponente B innerhalb von 38 min von 4 auf 40% erhöht. Hochaufgelöste Übersichtsspektren wurden in einem m/z -Bereich von 350-1500, $R=60.000$ und einem Targetwert von 4×10^5 aufgezeichnet. Precursorionen mit Ladungszuständen zwischen zwei und vier wurden mit einem massenselektiven Quadrupol innerhalb eines Isolationsfensters von m/z 1,6 ausgewählt und mittels EThcD und HCD im alternierenden Modus fragmentiert. Für die EThcD-Fragmentierung wurden ladungsabhängige ETD-Parameter und eine zusätzliche HCD-Aktivierung von 30% (NCE) genutzt. HCD-Fragmentspektren wurden mit 30% NCE gemessen. Alle Fragmentspektren wurden mit einer Auflösung von 15.000 aufgezeichnet.

5.4.3 Charakterisierung von Antikörperwirkstoffkonjugaten und deren Derivaten

5.4.3.1 LC-MS-Messung von Antikörper-Wirkstoffkonjugatuntereinheiten

Proteine wurden in deionisiertem Wasser aufgenommen und eine Konzentration von ca. 10 pmol/ μL eingestellt. Anschließend erfolgte die Analyse der Proteine mit dem in Kapitel 5.2.2 beschriebenen LC-MS-System. Für die chromatographische Trennung wurde ausschließlich der Ladekanal der HPLC-Anlage verwendet. Die Eluenten im Ladekanal setzten sich aus den Komponenten A (0,1% FA in Wasser) und B (0,1% FA in ACN) zusammen. Bei einer Flussrate von 400 $\mu\text{L}/\text{min}$ wurde der Anteil an Komponente B in einer Gradientenelution binnen 23 Minuten von 0 auf 80% erhöht und die Proteine mittels Reversed Phase Chromatographie (Chromatographiesäule: Waters Acquity™ UPLC BEH300 C_4 , 2,1 x 50 mm, 1,7 μm Partikeldurchmesser, 300 Å Porendurchmesser) getrennt. Für die Trennung wurde die Säule auf 60°C erwärmt. Nachdem die Proteine das chromatographische System passiert hatten, erfolgte die Ionisierung der Proteine im positiven Modus mit einer EASY-Max NG-Ionenquelle und einer Sprayspannung von 4,5 kV. Zur Unterstützung des Ionisierungsprozesses wur-

den 75 Einheiten Sheath Gas, 12 Einheiten AUX Gas und eine Einheit Sweep Gas eingesetzt und diese Quellengase auf eine Temperatur von 300 °C gebracht. Die mehrfach positiv geladenen Ionen wurden bei einer Ionentransferkapillartemperatur von 320 °C in das Massenspektrometer geleitet und im Intaktproteinmodus, welcher eine Druckreduktion innerhalb der Orbitrapzelle von $2,5 \times 10^{-10}$ Torr auf $1,4 \times 10^{-10}$ Torr beinhaltet, gemessen. Als Detektor wurde die Orbitrapzelle mit einer Auflösung von $R=15.000$ im hohen Massenbereich verwandt. MS-Spektren wurden mit einem AGC-Targetwert von $4e5$, einer maximalen Injektionszeit von 50 ms und einem Scanbereich von m/z 500-3000 aufgezeichnet. Zur Verbesserung des Signal-zu-Rauschverhältnisses wurden 10 Microscans zu einem MS-Scan zusammengefasst. Die generierten Daten wurden im Profilmodus dargestellt. Auf eine interne Kalibrierung mittels EASY-IC wurde verzichtet.

5.4.3.2 Dekonvolution der LC-MS-Spektren

Die MS-Daten wurden mit Hilfe der Software ProteinDeconvolut™ Version 3.0 (Thermo Fischer Scientific) ausgewertet. Dazu wurden ein m/z -Bereich von 800-3000 und Ladungszustände z von 10-100 berücksichtigt. Als Zielmasse wurde $M=30.000$ g/mol gewählt und das intakte Proteinmodell genutzt. Das dekonvolvierte Spektrum wurde in einem Massenbereich von 10.000 bis 70.000 ausgegeben.

5.4.3.3 Bottom-up-Proteomikansatz

Hydrolysierte Antikörper-Wirkstoffkonjugatuntereinheiten wurden nach In-Gel Verdau erhalten, in Wasser gelöst und mit dem in Kapitel 5.2.2 System analysiert. Reversed Phase chromatographische Trennungen wurden mit einer selbstgepackten Kapillarsäule (Säulenmaterial: Poroshell™ 120 EC-C18, 2,7 μm , Agilent Technologies), die einen Innendurchmesser von 75 μm und eine Länge von 50 cm besaß, durchgeführt. Die mobile Phase bestand aus einer Komponente A mit 0,1% Ameisensäure und einer mobilen Phase B mit 0,1% Ameisensäure in Acetonitril. Die mobile Phase wurde mit einer Flussrate von 300 nL/min bei einer Säulentemperatur von 50°C durch die Säule gepumpt. Innerhalb von 38 min wurde dabei der Anteil an Komponente B von 2 auf 38% erhöht. Nach Elektrosprayionisation mit einer Sprayspannung von 2,4 kV wurde FT-Übersichtsspektren mit einer Auflösung von $R=60.000$ (FWHM) und einem AGC-Targetwert von $4e5$ aufgezeichnet. Precursorionen mit Ladungszuständen zwischen zwei und vier wurden mit einem scannenden Quadrupol isoliert (Isolationsfenster: 1,6 Da). Precursorionen wurden sowohl mit HCD als auch mit EThcD im alternierenden Modus fragmentiert. HCD MS/MS-Spektren wurden mit einer normalisierten Kollisionsenergie von 30% erzeugt. Für die EThcD-Fragmentierung wurden ladungsabhängige ETD-Bedingungen und 30% zusätzliche Aktivierung (sa) gewählt. Für beide Fragmentierungstechniken wurde eine maximale In-

jektionszeit von 500 ms für die Sammlung von 5×10^4 Precursorionen angesetzt. Alle Fragmentionenspektren wurden mit einer Auflösung von $R=15.000$ (FWHM) aufgezeichnet.

5.4.4 Datenbankgestützte Auswertung synthetisch eingeführter Proteinmodifikationen

MS-Daten wurde mit der Software Proteome Discoverer™ der Versionen 2.1 und 2.2 (Thermo Fisher Scientific) ausgewertet. Der Nichtfragmentionenfilter wurde mit folgendem Parametern eingesetzt: Precursorionen und ladungsreduzierte Precursorionen wurden innerhalb eines Massenfensters von 1 Da ebenso von der Suche ausgeschlossen wie Neutralverluste innerhalb eines Fensters von 0,5 Da. Die MS/MS Spektren wurden mit Hilfe der Suchmaschine Sequest HT™ gegen eine Datenbank gesucht, welche die Aminosäuresequenzen der Myoglobinmutante, der Angiogeninmutante und der schweren und leichten Kette de Antikörpers Trastuzumab enthielt. Die Precursormassentoleranz wurde auf 10 ppm und die Fragmentionenabweichung auf 0,02 Da beschränkt. Oxidation von Methionin, Phosphorylierungen von S, T, C, K, H & R und Pyrophosphorylierungen an S & T bzw. Alkylierungen von Cystein und Phosphoamidierungen an Serin, Threonin, Tyrosin, Lysin, Histidin, Arginin und Cystein wurden als variable Modifikation gesucht. PSMs wurden mit Hilfe des Percolators und des Target Decoy Validators und einer FDR $<0,05$ gefiltert. Peptidmodifikationen wurden darüber hinaus mittels *ptmRS*™ (Version 3.0) unter Berücksichtigung diagnostischer Fragmentionen im PhosphoRS-Modus lokalisiert. Die identifizierten modifizierten Peptide wurden zusätzlich manuell verifiziert und deren Peakfläche bestimmt.

5.4.5 ETD und EThcD *top-down*-Experimente von Myoglobin

Selbstgezogene Nanoelektrospraykapillaren wurden mit ca. 2 μ L Proteinlösung ($C=10$ pmol/ μ L) gefüllt und mit Hilfe einer angelegten Elektrosprayspannung von 2,4 kV ionisiert. Die im positiven Modus erzeugten Ionen wurden mit Hilfe des Orbitrap Fusion™ Tribrid Massenspektrometers (Thermo Fisher Scientific) analysiert. Um mögliche Proteinaddukte und die Hydrathülle abzustreifen, ohne dabei das Protein zu fragmentieren und eine zuverlässige Ionentransmission zu gewährleisten, wurde eine geringe *in-source* Fragmentierungsspannung von 15 V angelegt. Die erzeugten Precursorionen wurden daraufhin mit einem Auflösungsvermögen von $R=120.000$ und 10 Microscans im Profilmodus gemessen um deren Isotopenverteilung und monoisotopische Masse bestimmen zu können. Das MS-Übersichtspektrum wurde in einem Bereich von 500-2000 m/z aufgezeichnet. Für das Erreichen des AGC-Targetwertes von 4×10^5 wurde eine maximale Injektionszeit von 50 ms zugelassen. Daraufhin wurden gezielt Precursorionen mit erkannten Ladungszuständen und m/z -Verhältnissen mit Hilfe eines massenselektiven Quadrupols in einem Isolationsfenster von 3 Da isoliert und in die Niederdruckzelle

der Ionenfalle transferiert. Bei ETD-MS/MS Experimenten wurden in der Zelle innerhalb einer maximalen Injektionszeit von 246 ms 3×10^5 Precursorionen gesammelt und mit 5×10^5 Ionen des ETD-Reagenz für 6 ms zur Reaktion gebracht. Für EThcD-Spektren wurde die gebildete Ionenpopulation einer zusätzlichen HCD-Fragmentierung mit einer normalisierten Fragmentierungsenergie (NCE) von 15% unterzogen. Die generierten Fragmentionen wurden daraufhin aus der Ionenfalle geschickt und in der Orbitrapzelle bei einem Auflösungsvermögen von $R=120.000$ und einem Massenbereich von 200-2000 m/z detektiert. Zur Verbesserung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses wurden zehn Microscans für ein Fragmentspektrum akkumuliert. Um eine hohe Massengenauigkeit sicher zu stellen und um auf die EASY-IC-Funktion verzichten zu können, wurde das Massenspektrometer vor der Messung kalibriert. Die Daten wurden mit der Software ProSight Lite™ ausgewertet.²⁸³

5.5 Ansatz zur Identifizierung von pLys auf dem Histon H1

5.5.1 Derivatisierung von pLys-Peptiden (Propionylierung)

Die Propionylierung basierte auf dem Protokoll von Garcia *et al.*²⁸⁹ Dazu wurde ca. 1 mM Peptid in 10 μ L Ammoniumhydrogencarbonat (*ammonium bicarbonate*, AmBic) (100mM) aufgenommen. Dem Puffer wurde danach 1 μ L konzentrierte Ammoniumhydroxidlösung hinzugegeben. 2 μ L frisch hergestelltes Propionylierungsreagenz (eine Mischung aus 75 μ L Propionsäureanhydrid und 25 μ L Methanol 99%) wurden der Lösung hinzugefügt, gemischt, für 15 min bei 30 °C inkubiert und zentrifugiert. Danach wurde der pH-Wert kontrolliert und wenn nötig mit 25%iger Ammoniaklösung auf pH=8 gebracht.

5.5.2 Derivatisierung von Histon H1(Propionylierung)

Für die Propionylierung des Histon H1 wurden 5 μ g Protein in 5 μ L AmBic (100mM) aufgenommen. Der Lösung wurden danach 2 μ L konzentrierte Ammoniaklösung hinzugegeben und weitere 20 μ L frisch hergestelltes Propionylierungsreagenz (eine Mischung aus 75 μ L Propionsäureanhydrid und 25 μ L Methanol 99%) hinzugefügt. Um den pH-Wert auf acht zu stellen wurden anschließend ca. 400 μ L konzentrierte Ammoniaklösung hinzugegeben. Inkubiert wurde für 20 min bei 30 °C. Nach der Zentrifugation wurde die Lösung bei 30 °C für 2 h in der Speedvac eingengt. Der Rückstand wurde in 10 μ L Verdaupuffer aufgenommen und in einem Verhältnis von 1:10 mit Trypsin für 13 h verdaut.

5.5.3 WCX zur Trennung von Proteinen

Für die WCX-Trennung stand eine Agilent 1260 Infinity™ II HPLC-Anlage mit Fraktionssammler (Santa Clara, USA) zur Verfügung. Gesteuert wurde die Anlage mit der Software ChemStation™ OpenLAB CDS Version 2.3.53. Sowohl der Autosampler als auch der Fraktionssammler wurden bei 4°C eingesetzt. Alle weiteren Komponenten der Anlage wurden bei Raumtemperatur betrieben. Die Aufzeichnung der Chromatogramme erfolgte bei Wellenlängen von 216 und 280 nm. Ein Gemisch aus fünf Standardproteinen (Myoglobin, bovines Serumalbumin, Cytochrom C, β -Casein und β -Lactoglobulin) mit verschiedenen molaren Massen und isoelektrischen Punkten wurde mit einer ProPac™ WCX-10 BioLC™ Analytiksäule (4 mm x 200 mm, 10 μ m, Thermo Fisher Scientific) getrennt. Der binäre Gradient bestand aus Komponente A (20 mM MES) und Komponente B (20 mM MES und 200 mM NaCl). Beide Komponenten wurden auf einen pH-Wert von 6,5 eingestellt. Folgender Gradient kam zum Einsatz:

Tabelle 9: Gradient der WCX zur Trennung von Proteinen.

Zeit (min)	Flussrate (ml/min)	Puffer A (%)	Puffer B (%)
0-0,01	1	99	1
0,01-20	1	65	35
20-30	1	20	80
30-35	1	20	80
35-36	1	99	1
36-45	1	99	1

5.6 Proteomikansatz zur Analyse labiler Phosphorylierungen

5.6.1 Kultivierung und Zellyse von HeLa-Zellen

HeLa-Zellen wurden in einem standardisierten Zellkulturnährmediums (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, DMEM, BioChrom, Berlin, 4500 mg/L Glucose mit Natriumbicarbonat, ohne L-Glutamin und Natriumpyruvat), zugesetzt mit 10% fötalem Kälberserum, Penicillin (100 U/mL) und Streptomycin (100 U/ml) bei 37°C und 5% CO₂ gehalten. Für die Passage der Zellen wurden diese mit warmen PBS-Puffer (Biochrom, Biochrom) gewaschen und mit 1 mL Accutase (BioWest, Eschweiler) Trypsin (0,05% (v/v)) für 2-5 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion durch Zugabe von 10 mL DMEM abgebrochen. Für die Zellyse wurden Zellen in einer 150cm² Zellkulturschale mit PBS gewaschen, mit einem Zellschaber geerntet und für 5 min bei 300 g zentrifugiert. Anschließend wurde mit PBS-Puffer gewaschen und mit 100 μ L Lysispuffer (8 M Harnstoff, 50 mM AmBic, einer Tablette (cOmplete™ Ultra Mini EDTA-frei, Roche, Basel, Schweiz) auf 10 mL H₂O) und PhosphoStop™ lysiert. Das Lysat

wurde für 3 x 10 s im Ultraschallbad behandelt, über 20 min bei 20.000 g zentrifugiert und die Proteinkonzentration vom Überstand mit einem BCA-Assay bestimmt.

Die erhaltenen Proteine wurden mit 3 mM Dithiothreitol (DTT) in 50 mM AmBic für 20 min bei 30°C reduziert, gekühlt und die freien Thiolgruppen der Cysteine mit 14 mM Ioacetamid (in 50 mM AmBic) für 45 min bei Raumtemperatur alkyliert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von DTT auf eine finale Konzentration von 7 mM abgebrochen. Die Harnstoffkonzentration wurde durch Zugabe von 50 mM AmBic auf 2 M reduziert. Der In-Lösungsverdau fand über Nacht (ca. 14 h) bei Raumtemperatur mit 2 % (w/w) Trypsin (sequencing grade modified, Promega) statt. Alle Schritte wurden, wenn möglich, unter Ausschluss von Licht durchgeführt.

Ca. 2 mg der tryptischen Peptide wurden mit 15 µL 10%iger Ameisensäurelösung auf einen pH-Wert von 3,5 gebracht und anschließend mit einer Tischzentrifuge Eppendorf 5427 (Eppendorf, Hamburg) für 5 min bei 4°C und 14.000 rpm zentrifugiert. Parallel dazu wurde eine tC₁₈-Sep-Pak™ Kartusche (Waters) zweimal mit jeweils 3 mL Methanol (MeOH), 3 mL 30%iger ACN-Lösung und 3 mL 0,1%iger Ameisensäure gespült. Der Zentrifugationsüberstand wurde danach auf die Kartusche geladen und zweimal mit jeweils 1 mL 0,1%iger Ameisensäure gewaschen. Die entsalzten Peptide wurden zweimal mit jeweils 500 µL 30%iger ACN-Lösung eluiert. Zur Neutralisation und pH-Werteinstellung wurden 15 µL 5%ige Ammoniaklösung vorgelegt. Die Beladung, das Waschen und die Elution erfolgten mit eisgekühlten Puffern. Die eluierten Peptide wurden abschließend bei Raumtemperatur in der SpeedVac Savant™ SPD1010 (Thermo Fisher Scientific) eingengt und mit verschiedenen Anreicherungsverfahren aufgearbeitet.

5.6.2 Phosphopeptidanreicherung mittels SAX

Die SAX-Trennung erfolgte auf der unter Kapitel 5.5.3 beschriebenen HPLC-Anlage. Die entsalzten, tryptischen Peptide (ca. 2 mg) wurden mit einer PolySAX™ LP-Säule (4,6 mm x 200 mm, 5 µm, 300 Å, Poly LC, Columbia, USA) und einem binären Gradienten bestehend aus Komponente A (20 mM Ammoniumacetat, 10% ACN) und Komponente B (300 mM Triethylammoniumphosphat, 10% ACN) bei einem pH-Wert von 6,8 getrennt. Die Trennung wurde wie folgt durchgeführt:

Tabelle 10: Gradient der SAX zur Anreicherung von Phosphopeptiden.

Zeit (min)	Flussrate (ml/min)	Puffer A (%)	Puffer B (%)
0-0,01	1	100	0
0,01-5	1	100	0
5-43	1	0	100
43-48	1	0	100
48-50	1	100	0
50-60	1	100	0

Fraktionen wurden von Beginn an bis Minute 48 gesammelt und jeweils drei Fraktionen miteinander vereinigt, sodass man insgesamt 16 Fraktionen erhielt, welche im Anschluss lyophilisiert wurden. Die hohen Salzfrachten wurden im Anschluss mittels StageTips entfernt.

StageTips wurden mit jeweils drei Scheiben C18-Material (Empore™ Octadecyl Solid Phase Extraction disks, Supelco,) in einer 200 µL Pipettenspitze angefertigt. Diese Spitzen wurden nacheinander mit jeweils 100 µL MeOH, 50%iger ACN-Lösung und Wasser durch Zentrifugation mit einer Sonation STC-V2-Tischzentrifuge (Sonation Labsolutions, Biberach) bei einer Drehzahl von 6.200 rpm gewaschen. Der Rückstand der SAX-Fraktionen wurde in 100 µL Wasser aufgenommen und die Stage-Tips damit beladen. Der Durchfluss wurde nicht verworfen, sondern ein weiteres Mal zum Beladen der Stage-Tips genutzt. Danach wurden die Peptide mit 100 µL Wasser gewaschen und mit 50 µL 50%iger ACN-Lösung eluiert. Die Eluate wurden abschließend in der SpeedVac unter Raumtemperatur getrocknet und für die LC-MS-Analyse in Wasser aufgenommen.

5.6.3 Phosphopeptidanreicherung mittels TiO₂

Titansphere™ TiO₂ beads (MZ-Analysentechnik, Mainz) wurden mit einer DHB-Lösung (30 mg/mL in 80%ACN) in einem Verhältnis von 50 µL DHB-Lösung auf 5 mg TiO₂ für 10 min in der Dunkelheit mit einem Überkopfschüttler inkubiert. Parallel dazu wurde das entsalzte Lysat in AmBic aufgenommen und eine Konzentration von 5mg/mL eingestellt. Es folgte der erste Anreicherungszyklus: Dazu wurden ca. 0,5 mg/mL Protein mit 1450 µL Waschlösung I (30% ACN, pH=3,2 oder 2,7 (TFA)) in einem 2 mL Eppendorfgefäß mit 50 µL des TiO₂/DHB Gemisches für 30 min bei Raumtemperatur unter Ausschluss von Licht geschüttelt. Danach wurde für 2 min bei 1050 g und 12 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde für einen weiteren Anreicherungszyklus verwendet. Der Ablauf des Beladens der Beads, des Waschens und der Elution wird dann noch dreimal wiederholt. Waschlösung I.1 wurde in 1500 µL 30% ACN pH=3,2 aufgenommen für 10 min in der Dunkelheit inkubiert bei Raumtemperatur inkubiert und danach für 2 min bei 1050 g und 12 °C zentrifugiert. Waschlösung I.2 wurde ebenfalls gelöst, inkubiert, zentrifugiert und der Überstand verworfen. Mit Waschlösung II wurde in gleicher Weise verfahren. Abschließend wurden 1450 µL Überstand abgenommen und mit 100 µL der Waschlösung II vereinigt. Danach wurden die Beads aus dem Eppendorfgefäß entfernt und damit Stage Tips gepackt mit drei Lagen C8-Material (Empore™ Octyl Solid Phase Extraction disks, Supelco) beladen. Die Tips wurden danach für 9 min bei 1050 g und 12 °C zentrifugiert bis kein Überstand mehr zu sehen war. Für die Elution der Peptide wurden die Tips jeweils dreimal mit 100 µL 40%iger Ammoniaklösung in ACN (v/v) für 3 min bei 1050 g und 12 °C gewaschen und das Eluat aufgefangen. Das eisgekühlte Eluat wurde danach in der Speedvac auf ca. 50 µL eingeeengt, in Probenvials überführt und bis zur Trockene eingeeengt. Der Rückstand wurde für die LC-MS-Analyse in 3% ACN-Lösung aufgenommen.

5.6.4 Phosphopeptidanreicherung mittels Fe³⁺-IMAC

Für die Fe³⁺-IMAC-Anreicherung stand die in Kapitel 5.5.3 beschriebene Anlage zur Verfügung. Die Methodik basierte auf dem von Potel *et al.* publizierten Verfahren zur Anreicherung von Phosphohistidinpeptiden und wurde für die verwendete HPLC-Anlage angepasst.²⁶ Die entsalzten, tryptischen Peptide (ca. 2 mg) wurden in 80 µL eiskalten Laufpuffer A aufgenommen, mit 20 µL 10%iger TFA-Lösung auf einen pH-Wert von 2,3 gebracht und damit die Fe³⁺-IMAC-Anreicherungssäule (Propac™ IMAC-10, 4 x 50 mm, Thermo Fisher Scientific) beladen. Puffer A setzte sich aus 0,07% TFA, 30% ACN und Wasser zusammen. Puffer B bestand aus einer 0,3% igen Ammoniaklösung. Folgendes Gradientenprofil wurde eingesetzt:

Tabelle 11: Gradient der Fe³⁺-IMAC Phosphopeptidanreicherung.

Zeit (min)	Flussrate (ml/min)	Puffer A (%)	Puffer B (%)
0-0,3	1,0	100	0
0,3-7,0	0,1	100	0
7,01-12,0	1,0	100	0
12,01-13,5	1,0	50	50
13,51-16,0	0,5	50	50
16,1-25,0	1,0	100	0

Ab einer Retentionszeit von 12 min wurde für sechs Minuten das Eluat aufgefangen. Das Gemisch wies einen pH-Wert von ca. 8,0 auf und wurde in der Vakuumzentrifuge eingengt. Um diesen Prozess zu beschleunigen wurde das Eluat auf mindestens 10 Aliquote aufgeteilt und alle Aliquote parallel eingengt. Der erhaltene Rückstand wurde für die LC-MS-Messung direkt in Wasser aufgenommen oder für eine zusätzliche Fraktionierung mittels RP-HPLC in Laufpuffer A gelöst.

Vor dem ersten Gebrauch wurde die Säule mit drei Säulenvolumen 20 mM Ameisensäure gespült. Die Beladung mit Eisenkationen erfolgte mit einer Lösung aus 25 mM Eisen-III-chlorid und 100 mM Essigsäure. Nach der Beladung wurde die Säule mit mehr als 20 Säulenvolumen gespült.

Vor dem Gebrauch der Säule ist darauf zu achten, dass die HPLC-Anlage möglichst salzfrei ist, da dies eine Reduktion der Bindungsfähigkeit verursachen kann.

5.6.5 Fraktionierung eines HeLa-Proteoms mittels RP-HPLC

5.6.5.1 Schwach basische RP-HPLC-Bedingungen

Reversed-Phase chromatographische Fraktionierungen wurden mit Hilfe einer Ultimate™ Plus HPLC-Anlage von LC Packings (Thermo Fisher Scientific) durchgeführt. Die Steuerung erfolgte über die Software Chromeleon™ Version 6.60. Das Chromatogramm wurde bei Wellenlängen von 215 und

280 nm aufgezeichnet. Die chromatographische Trennung erfolgte mit einer XBridge™ Peptide BEH C₁₈ Säule (3,5 µm, 130 Å, 1 mm x 150 mm, Waters). Puffer A enthielt 10 mM NH₄HCO₃ und 2% ACN. Puffer B setzte sich aus 10 mM NH₄HCO₃ und 80% ACN zusammen. Beide Laufmittel wurden auf einen pH-Wert von 8 eingestellt. Folgende zwei Gradienten fanden Anwendung:

Tabelle 12: Gradient 1 der basischen RPLC.

Zeit (min)	Flussrate (µl/min)	Puffer A (%)	Puffer B (%)
0-10	50	99	1
10-70	50	73	27
70-78	50	40	60
78-79	50	5	95
79-83	50	5	95
83-84	50	99	1
84-110	50	99	1

Tabelle 13: Gradient 2 der basischen RPLC.

Zeit (min)	Flussrate (µl/min)	Puffer A (%)	Puffer B (%)
0-5	50	99	1
5-60	50	73	27
60-68	50	40	60
68-69	50	5	95
69-73	50	5	95
73-74	50	99	1
74-100	50	99	1

Gradient 1 wurde bei Proben eingesetzt, welche neben den Peptiden noch Verunreinigungen (wie z.B. Salze) enthielten. Um diese abzutrennen, erfolgte das Sammeln von Fraktionen ab einer Retentionszeit von 10 min. Drei verschiedene Poolingstrategien wurden dabei verwandt. Eine Strategie sah vor, in sechs Zyklen zehn verschiedene Fraktionen in einer Gesamtzeit von 60 min zu sammeln. Bei der zweiten Strategie wurden sechzehn Fraktionen gesammelt. Diese ergaben sich aus vier durchlaufenen Zyklen, sodass die Fraktionierung über 64 min andauerte. Die dritte Methodik umfasste acht Zyklen, wobei in jedem Zyklus acht Fraktionen gesammelt wurden und somit über einen Zeitraum von 64 min die Fraktionierung durchgeführt wurde. Bei allen Strategien wurden demzufolge Fraktionen in einer Länge von 1 min gesammelt.

Gradient 2 wurde bei der Fraktionierung von Proben mit einem geringen Anteil an Verunreinigungen oder in diesem pH-Wertbereich äußerst polaren Peptiden verwendet. In diesem Fall wurde auf den

zehnminütigen Waschschrift zu Beginn verzichtet und sofort der Anteil an Komponente B kontinuierlich erhöht. Das Sammeln der Fraktionen erfolgte ab dem Zeitpunkt der Totzeit und nach den bereits beschriebenen Strategien.

5.6.5.2 Saure RP-HPLC-Bedingungen

Für die Fraktionierung unter sauren Bedingungen wurde die oben beschriebene HPLC-Anlage verwendet. Als chromatographische Säule stand eine Acclaim™ PepMap100 C₁₈-Säule (5 µm, 100 Å, 1 mm x 250 mm, Thermo Fisher Scientific) zur Verfügung. Die mobile Phase setzte sich aus der Komponente A (0,1% FA & 1% ACN) und der Komponente B (0,1% FA und 80% ACN) zusammen. Die Trennung erfolgte nach folgendem Gradienten:

Tabelle 14: Gradient der sauren RPLC.

Zeit (min)	Flussrate (µl/min)	Puffer A (%)	Puffer B (%)
0-2	40	99	1
2-84	40	50	50
84-92	40	35	65
92-94	40	5	95
94-96	40	5	95
96-98	40	99	1
98-128	40	99	1

Für die Fraktionierung wurde ebenfalls eine Poolingstrategie verwendet. Ab einer Retentionszeit von 15 min wurden Fraktionen gesammelt, wobei vier Zyklen mit jeweils acht Proben durchlaufen wurden. Da die Fraktionslänge auf 140 s festgelegt war, ergab sich eine Gesamtfractionierungszeit von 75 min.

5.6.6 LC-MS-Analyse der Fraktionen nach basischer und saurer Fraktionierung

Die eingegangenen Fraktionen wurden in 5 µL deionisiertem Wasser aufgenommen. Danach erfolgte die Analyse der Peptide mit einem Reversed-Phase-Kapillarchromatographischen System (Dionex Ultimate 3000 NCS-3500RS Nano (Thermo Fisher Scientific) gekoppelt mit einem Orbitrap Elite™ Massenspektrometer (Thermo Fisher Scientific). Die Steuerung des Systems erfolgte über die Software Xcalibur™ Version 2.2 und Chromeleon™ Xpress. Als Trapping-Säule kam eine PepMap™ C18-Vorsäule (5 µm, 100 Å, 5 mm x 300 µm, Thermo Fisher Scientific) zum Einsatz.

Diese wurde beladen und die Peptide durch Spülen mit 2% Eluent A entsalzt sowie aufkonzentriert. Die Laufmittel im Ladekanal setzten sich aus den Komponenten A (0,1% TFA in Wasser) und B (0,1% TFA in ACN) zusammen und wurden mit einer Flussrate von 300 $\mu\text{L}/\text{min}$ für 25 min über die Vorsäule gepumpt. Danach wurde die Vorsäule in den analytischen Strom geschaltet und die Peptide mittels NanoLC getrennt. Die chromatographische Trennung erfolgte mit einer Acclaim™ PepMap™ Säule (Thermo Fisher Scientific) in einer Länge von 250 mm und einem Durchmesser von 0,075 mm. Gepackt war die Trennsäule mit 3 μm großen Partikeln mit einer Porengröße von 120 Å. Als Laufmittel kamen die Komponente A mit 0,1% Ameisensäure in Wasser und die Komponente B mit 0,1% Ameisensäure in Acetonitril zum Einsatz. Komponente B wurde in 65 min von 0 auf 30% erhöht und in weiteren zehn Minuten auf 50% erhöht. Die Ionisierung der Analyten erfolgte im positiven Modus bei einer Elektrosprayspannung von 2,1 kV. Die Precursorionen wurden bei einer Ionen transfertemperatur von 275 °C in den Massenspektrometer geleitet. Massenspektren wurden im datenabhängigen Aufnahmemodus (data dependent acquisition, DDA) aufgezeichnet. FTMS-Übersichtsspektren wurden für den Massenbereich von 350 bis 1500 m/z bei einem Auflösungsvermögen von 60.000 aufgezeichnet. Um den AGC-Targetwert von 1×10^6 zu erreichen, wurde eine maximale Injektionszeit von 50 ms angewendet. Die 15 höchstabundantesten Peaks wurde einer CID-Fragmentierung unterzogen. Als dynamische Ausschlusszeit wurden 60 s eingesetzt. Fragmentspektren wurden in der Ionenfalle bei einem Targetwert von $3e3$ und einer maximalen Injektionszeit von 40 ms aufgezeichnet. Es wurde eine normalisierte Kollisionsenergie NCE von 35% eingesetzt.

5.6.7 Datenbankgestützte Auswertung der Fraktionierung eines HeLa-Proteoms

Die aufgezeichneten Rohdaten wurden mit der Software Proteome Discoverer™ Version 2.1 (Thermo Fischer Scientific) ausgewertet. Als Suchmaschine wurde Sequest™ mit einer Precursormassentoleranz von 10 ppm und einer Fragmentionentoleranz von 0,3 Da verwendet. Die Daten wurden gegen eine humane Proteomdatenbank gesucht. Oxidationen von Methionin, Alkylierungen von Cystein und Phosphoamidierungen an Serin, Threonin, Tyrosin, Lysin, Histidin, Arginin und Cystein wurden als variable Modifikation gesucht. Die Peptide Spektrum Matches (PSMs) wurden mit dem Percolator und einer False Discovery Rate (FDR) <0.05 gefiltert.

5.6.8 Phosphoimmonium getriggerte EThcD zur Identifizierung von pLys-Peptiden

Phosphoproteome wurde mit dem in Kapitel 5.2.2 beschriebenen nanoLC-MS/MS System analysiert. Die Peptide wurden auf eine PepMap™ C18-Vorsäule (5 μm , 100 Å, 5 mm x 300 μm , Thermo Fisher Scientific) geladen und durch Spülen mit 2% Eluent B entsalzt sowie aufkonzentriert. Die Laufmittel

im Ladekanal setzten sich aus den Komponenten A (0,1% FA in Wasser) und B (0,1% FA in ACN) zusammen und wurden mit einer Flussrate von 12 $\mu\text{L}/\text{min}$ für 65 min über die Vorsäule gepumpt. Danach wurde die Vorsäule in den analytischen Strom geschaltet und die Peptide mittels NanoLC getrennt. Die chromatographische Trennung erfolgte mit einer selbst gepackten Kapillarsäule (Säulenmaterial: Poroshell™ 120 EC-C18, 2,7 μm , Agilent Technologies), die einen Innendurchmesser von 75 μm und eine Länge von 50 cm besaß. Als Laufmittel kamen die Komponente A mit 0,1% Ameisensäure in Wasser und die Komponente B mit 0,1% Ameisensäure in Acetonitril zum Einsatz. Für die Trennung der Peptide wurde Komponente B innerhalb von 150 min auf 34% erhöht. Dies geschah bei einer Säulentemperatur von 30°C. Sobald die Analyten das chromatographische System verlassen hatten, erfolgte deren Ionisierung im positiven Modus bei einer Elektrosprayspannung von 2,1 kV. Die Precursorionen wurden bei einer Ionentransfertemperatur von 275 °C in den Massenspektrometer geleitet. Massenspektren wurden im datenabhängigen Aufnahmemodus (data dependent acquisition, DDA) aufgezeichnet. FTMS-Übersichtsspektren wurden für den Massenbereich von 375 bis 1500 m/z bei einer Auflösung von 60.000 (FWHM) unter Verwendung der EASY-IC-Funktion aufgezeichnet. Zum Erreichen des AGC-Targetwert von 4×10^5 , wurde eine maximale Injektionszeit von 50 ms zugelassen. Die monoisotopischen Spezies von zwei bis vierfach geladenen Precursorionen wurden für die Fragmentierung ausgewählt, wobei Vorläuferionen mit hohem Ladungszustand bevorzugt fragmentiert wurden. Die Precursor wurden mit einem massenselektiven Quadrupol innerhalb eines Isolationsfensters von 1.6 m/z isoliert. Als dynamische Ausschlusszeit wurden 30 s verwendet. Ab einem Schwellenwert von 5×10^4 wurden HCD MS/MS Spektren mit einer normalisierten Kollisionsenergie von 30% und einem AGC-Targetwert von $2,5 \times 10^4$ aufgezeichnet. Für die Isolierung der Vorläuferionen standen 120 ms zur Verfügung. Die Injektion von Precursorionen zu jeder möglichen, parallelisierbaren Zeit wurde zugelassen. Die generierten Fragmentationen wurden in Abhängigkeit der Komplexität der Probe mit einer Auflösung von 15.000 bzw. 30.000 (FWHM) im Centroidmodus detektiert. Sobald eines der drei Fragmente (m/z 164,047; 181,074 oder 190,037) innerhalb eines Massenfensters von ± 10 ppm auftrat, wurde ein zusätzliches EThcD Fragmentationspektrum des gleichen Precursorions aufgezeichnet. Für die getriggerte EThcD Fragmentierung wurde eine maximale Injektionszeit von 1000 ms bei einem AGC-Targetwert von 1×10^5 zugelassen. Die generierten EThcD-Fragmentenspektren wurden mit einer Auflösung von 60.000 (FWHM) als profile Daten aufgezeichnet. Für den ETD-Prozess wurden kalibrierte, ladungsabhängige ETD-Parameter verwendet und die zusätzliche Fragmentierung mittels HCD zugelassen. Die normalisierte Kollisionsenergie der zusätzlichen Aktivierung betrug 30%.

5.7 LC-MS-Methode zur Analyse pyrophosphorylierter Peptide

5.7.1 Synthese pyro- und diphosphorylierter Peptide

Die Pyrophosphopeptide wurden nach einem weiterentwickelten Verfahren von Marmelstein *et. al* synthetisiert.⁷⁴ Zu Beginn wurden Phosphopeptide nach traditioneller Fmoc-basierter Festphasensynthese (SPPS) hergestellt.³⁰⁵ Eine Suspension von Phosphopeptiden (4-6 μmol) im DMA wurde mit einer Lösung aus Lithiumbenzyl-1*H*-imidazol-1-ylphosphonate (3 äq, 12-18,0 μmol) in DMA und eine Lösung aus ZnCl_2 (8 äq, 32-48,0 μmol) in H_2O behandelt. Für eine optimale Löslichkeit setzte sich das Lösungsmittelgemisch aus 15% H_2O in DMA (3-4 μM) zusammen. Die erhaltene Lösung wurde auf 45 °C erhitzt und für 1,5-2 h gerührt, bis eine klare Lösung erhalten wurde. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend über einen 0,22 μm Spritzenfilter gegeben und mit einer präparativen HPLC aufgereinigt. Die vereinigten Fraktionen wurden unter Vakuum eingeeengt und das benzylgeschützte, weiße, kristalline Intermediat erhalten. Einer Lösung des Intermediates (5-7 μmol) in 15% DMA in H_2O (3-4 μM) wurden Palladium auf Kohlenstoff (10%, 50% feucht, 2 äq., 10-14,0 μmol) und Triethylamin (4 äq, 20-28 μmol) hinzugegeben. Das mit einem Septum abgeschlossene Probenröhrchen wurde unter N_2 -Atmosphäre gespült. Nach 12-15 Stunden langem Rühren wurde das Reaktionsgemisch über einen 0,22 μm Spritzenfilter filtriert und mit 100-200 μL H_2O gewaschen. Das Filtrat wurde danach chromatographisch aufgereinigt und die pyrophosphorylierten Peptide isoliert. Die gewünschten Fraktionen wurden unter Vakuum konzentriert und ein weißer Feststoff isoliert. Die Reinheit der Peptide wurde mittels analytischer HPLC bestimmt und die Identität der Peptide mit hochauflösender Massenspektrometrie und ^{31}P NMR bestätigt.

Diphosphorylierte Peptide wurden nach einem Standard Fmoc-SPPS-Protokoll synthetisiert. Die Reinheit der isolierten Peptide wurde mit analytischer HPLC untersucht und die Identität der Peptide mit hochauflösender Massenspektrometrie nachgewiesen.

5.7.2 Massenspektrometrische Analyse pyro- und diphosphorylierter Peptide

Die synthetischen Peptide wurden in deionisiertem Wasser aufgenommen und eine Konzentration von ca. 5 pmol/ μL eingestellt. Anschließend erfolgte die Analyse der Peptide mit dem in Kapitel 5.2.2 beschriebenen nanoLC-MS-System. Als Laufmittel kamen die Komponente A mit 0,1% Ameisensäure in Wasser und die Komponente B mit 0,1% Ameisensäure in Acetonitril zum Einsatz. Bei einer Flussrate von 200 nl/min wurde eine Gradientenelution durchgeführt, wobei der Anteil an Komponenten B innerhalb von 45 min von 2 auf 30% erhöht wurde.

Die Ionisierung der Analyten erfolgte im positiven Modus bei einer Elektrosprayspannung von 2,4 kV. Die entstandenen Precursorionen wurden bei einer Iontentransfertemperatur von 275 °C in den Massenspektrometer geleitet. Massenspektren wurden im datenabhängigen Aufnahmemodus (data depen-

dent acquisition, DDA) aufgezeichnet. Ein hochaufgelöstes Übersichtsspektrum wurde in einem Massenbereich von 350 bis 1500 m/z und einer Auflösung von 120.000 (FWHM) gemessen. Zur Erhöhung der Massengenauigkeit wurde die Easy-IC-Funktion, als Lockmasse, genutzt. Zum Erreichen des AGC-Targetwertes von 2×10^5 wurde eine Injektionszeit von 50 ms zugelassen. Daran schlossen sich im top-speed Modus MS/MS-Scans von den Signalen mit höchster Intensität an. Dazu wurden Precursorionen, welche eine Signalintensität von $1e5$ erreichten, mit Hilfe eines massenselektiven Quadrupols in einem Isolationsfenster 1.6 m/z isoliert und mittels CID, HCD oder EThcD fragmentiert. CID Fragmentationspektren wurden in der Ionenfalle mit einem AGC-Targetwert von 1×10^4 und verschiedenen normalisierten Kollisionsenergien, welche von 25 bis 35% reichten, generiert und als centroide Daten erfasst. Zusätzlich wurden ebenfalls hochaufgelöste CID MS/MS Spektren mit einer Auflösung von 30.000 (FWHM) als profile Daten aufgezeichnet. HCD MS² Spektren wurden mit einer normalisierten Kollisionsenergie von 30% und einem AGC-Targetwert von 5×10^4 aufgezeichnet. Für die Fragmentierung mittels EThcD wurden ladungsabhängige ETD-Parameter für den Elektrontransferprozess gewählt und eine zusätzliche Aktivierung mittels HCD zugelassen. Die zusätzliche normalisierte Fragmentierungsenergie richtete sich nach dem Ladungszustand des Vorläuferions. Sowohl HCD als EThcD Fragmentspektren wurden in der Orbitrapzelle mit einer Auflösung von 15.000 (FWHM) gemessen.

5.7.3 Ionenmobilität pyro-und diphosphorylierter Peptide

Für Direktinjektionen wurden wässrige Lösungen bestehend aus ca. 1 pmol di- und pyrophosphorylierter Peptide hergestellt und diese mit einer Advion TriVersa™ NanoMate (Advion, Ithaca, NY, USA), chipbasierten Elektrosprayionisationsquelle ionisiert. Die Sprayspannung lag zwischen 1340 und 1680 V wobei ein Strom von 80 bis 120 nA floss. Der Druck lag zwischen 0,3 und 0,5 bar und die Distanz zwischen Chip und Kapillare betrug ca. 2,5 mm. Als Massenspektrometer kam ein timsTOF Pro™ (Bruker, Billerica, Massachusetts, USA) zum Einsatz. Hochaufgelöste MS wurden in einem Massenbereich von m/z 100- 1700 im positiven Modus aufgezeichnet. Trappedionenmobilitätstrennungen (TIMS) wurden im Standardmodus mit 100% Duty cycle und einer ramp time von maximal 350 ms durchgeführt. Es wurden sowohl Fullscans als auch MRMs aufgezeichnet.

5.7.4 Neutralverlustgetriggerte EThcD-Experimente

Für Spike-in-Experimente wurden ca. 100 fmol des Peptides ISIDppTSDEESELKK (PP-8) und 0,5 µg eines standardisierten HeLa-Proteinverdaus (Pierce, Thermo Fisher Scientific) in 5 µL Wasser aufgenommen. Vor jeder Sequenz von Messungen wurde das komplette chromatographische System,

inklusive Trappingsäule und analytischer Trennsäule, mit 0,1% iger Zitronensäure in 1% ACN gespült, um möglicherweise im System enthaltene Kationen (wie zum Beispiel Fe^{2+}) zu chelatisieren und zu entfernen. Unter Verwendung der bereits im Kapitel 5.6.5.1 beschriebenen, chromatographischen Bedingungen und des instrumentellen Aufbaus wurden neutralverlustgetriggerte EThcD MS/MS Experimente wie folgt durchgeführt: FTMS-Übersichtsspektren wurden in einem Bereich von 350 bis 1500 m/z bei einem Auflösungsvermögen von 120.000 aufgezeichnet. Zur Erhöhung der Massengenauigkeit wurde die Easy-IC-Funktion, als Lockmasse, genutzt. Um den AGC-Targetwert von 2×10^5 zu erreichen, wurde eine maximale Injektionszeit von 50 ms angewendet. Die monoisotopischen Spezies von zwei und dreifach geladenen Precursorionen wurden für die Fragmentierung ausgewählt, wobei Vorläuferionen mit hohem Ladungszustand bevorzugt fragmentiert wurden. Die Vorläuferionen wurden mit einem massenselektiven Quadrupol aus dem Ionenstrahl innerhalb eines Isolationsfensters von m/z 1,6 isoliert. Um eine wiederholte Fragmentierung hochabundanter Precursorionen zu verhindern, wurde das dynamische Ausschlussverfahren eingesetzt und verschiedene Intervalle zwischen 10 und 40 s erprobt. CID-MS/MS Spektren wurden mit einer normalisierten Kollisionsenergie 25% und einem AGC-Targetwert von 5×10^3 durchgeführt. Für die Isolierung der Vorläuferionen standen 50 ms zur Verfügung. Die generierten Fragmentionen wurden im Rapidmodus in der Ionenfalle als centroide Daten detektiert. Sobald Neutralverluste von m/z 49 und m/z 89 bei einem zuvor doppelt geladenen Precursorion auftraten, diese zu den fünf intensivsten Signalen zählten und eine relative Abundanz $\geq 15\%$ aufwiesen, wurde ein zusätzliches Fragmentationspektrum des gleichen Precursorions aufgezeichnet. Für die Fragmentierung dreifachgeladener Vorläuferionen galt, sobald Neutralverluste von m/z 32,7 und m/z 59,3 detektiert wurden, die ebenfalls mindestens eine relative Intensität von über 15% aufwiesen und zu den sechs häufigsten Fragmenten zählten, wurde ein zusätzliches ETHCD-Spektrum aufgezeichnet. Für die getriggerte EThcD Fragmentierung wurde eine maximale Injektionszeit von 1000 ms bei einem AGC-Targetwert von 1×10^5 zugelassen. Die generierten EThcD-Fragmentspektren wurden in der Orbitrap-Zelle mit einer Auflösung von 15.000 (FWHM) als profile Daten detektiert. Für den ETD-Prozess wurden kalibrierte, ladungsabhängige ETD-Parameter verwendet und die zusätzliche Fragmentierung mittels HCD zugelassen. Die normalisierte Kollisionsenergie der zusätzlichen Aktivierung wurde wie folgt dem Ladungszustand angepasst: Zuvor doppelt geladene werden mit 50% sa und dreifach geladene Vorläuferionen mit 25% normalisierter Kollisionsenergie fragmentiert. Normalisierung der Kollisionsenergie bezieht sich dabei auf den Ladungszustand des ursprünglichen Vorläuferions.

5.8 Identifizierung endogener Proteinpyrophosphorylierungen

5.8.1 Identifizierung von Proteinpyrophosphorylierungen in *S. cerevisiae*

5.8.1.1 Kultivierung und Zellyse von Hefezellen

Der folgende Hefestamm wurde untersucht: Wildtyp (WT) Genotyp: *his3Δ1leu2Δ0lys2Δ0ura3Δ0*. Die Herstellung des Hefezelllysats, die Proteinreduktion –und alkylierung, der Trypsinverdau und die Peptidsalzungsschritte wurden nach einem überarbeiteten Prozedere von Villén und Gygi durchgeführt.¹¹¹ Die Zellen wurden bei 30 °C bis zur Mid-log Phase (OD (600nm) = 0.600-0.700) in YPDA Medium kultiviert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation mit 3,000 rpm für 5 min bei 4 °C geerntet. Das Pellet wurde mit 50 mM Tris-HCl (pH 7,50; 10,0 mL) gewaschen und durch Zentrifugation bei 3.000 rpm für 5 min bei 4 °C isoliert.

Für die Herstellung von Zelllysaten wurden zwei EDTA-freie Tabletten Proteaseinhibitoren (Roche Life Sciences) dem MS-Lysepuffer, welcher Phosphataseinhibitoren (8 M Harnstoff, 75 mM NaCl, 50 mM Tris (pH 8,2), 50 mM NaF, 50 mM β -Glycerophosphat, 1 mM Natriumorthovanadat, 10 mM Natriumpyrophosphat, 1 mM PMSF; 10,0 mL) enthielt, hinzugefügt. Alle Schritte wurden bei 4 °C durchgeführt. Ein Zellpellet wurde mit jeweils 300 μ L MS-Lysepuffer behandelt. Die Zelllösung wurde in verschraubbare Probenröhrchen überführt und Glaskügelchen hinzugefügt. Die Zellen wurden mit FastPrep (MP Biomedicals, Santa Ana, USA), unter Verwendung gebräuchlicher Bedingungen (6,5 m/s für 3 x 60 Sekunden mit 1 min Pausen zwischen Zyklen), aufgeschlossen. Nach der Zellyse wurde ein Loch in den Boden des Röhrchens gebohrt und die Probe wurde von den Glaskügelchen durch Zentrifugation bei 6.000 rpm entfernt. Zellbruchstücke wurden durch Zentrifugation bei 11.800 rpm für 10 min entfernt. Der Überstand wurde entfernt und die Proteinkonzentration wurde mit einem BCA-Kit (Pierce, Thermo Scientific) bestimmt.

Für die Reduktion der Proteine wurde ein 1 mL Zelllysats mit 5 mM DTT bei 56°C für 25 min inkubiert. Danach wurden die Proben auf Raumtemperatur abgekühlt, mit 14 mM Iodacetamid versetzt und für 30 min in der Dunkelheit geschüttelt. Die Proben wurden dann mit einer weiteren Portion DTT (finale Konzentration: 10 mM) gequentscht und für weitere 15 min bei Raumtemperatur in der Dunkelheit geschüttelt.

Für den tryptischen Verdau wurden die reduzierten und alkylierten Proteine in 25 mM Tris-Puffer pH 8,0 in einem Verhältnis von 1:5 aufgenommen. Der Verdau wurde mit Trypsin (Promega) in einem Verhältnis von 1:200 und 1 mM CaCl_2 über Nacht bei einer Temperatur von 37 °C durchgeführt. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurden die Proben mit TFA auf eine Endkonzentration von 0,4% gebracht und für 10 min bei 2.500 g zentrifugiert.

Die Entsalzung der Peptide erfolgte mit 500 mg Waters C_{18} SepPak-Kartuschen. Dazu wurden die Kartuschen zuerst mit 9 mL ACN und anschließend mit 50% ACN in H_2O mit 0.5% AcOH gewaschen. Die Säule wurde danach mit 9 mL 0,1% TFA in H_2O gewaschen und mit den verdauten Pepti-

den in 0,4% TFA-Lösung beladen. Die Peptide wurden anschließend mit 9 mL 0,1% TFA-Lösung und 900 μ L 0,5% AcOH-Lösung gewaschen. Abschließend wurden die Peptide mit 5-6 mL 50% ACN mit 0.5% AcOH eluiert und unter Erhalt eines weißen Rückstandes gefriergetrocknet.

5.8.1.2 Anreicherung mit Zn-DPA-Komplex

Der zinkbeladene, harzgebundene Dipicolylaminkomplex (Zn-DPA) wurde mit Hilfe eines primäre Amine enthaltenden DPA-Liganden und Affi-Gel™ 10 (Bio-Rad, Hercules, USA) basierend auf dem Verfahren von Conway *et. al* hergestellt (vgl. Kapitel.1.2.3).¹⁴³ Alle folgenden Schritte zur Herstellung des Affinitätsreagenzes wurden bei 4 °C durchgeführt. 500 μ L Affi-Gel 10 (15 μ mol/mL) wurden mit dreimal mit jeweils 1 mL DMF gewaschen und für 3 min bei 5.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und verworfen. Aus dem Rückstand wurde eine Stammlösung bestehend aus 3,3 mg Ligand und 5,5 mL DMF hergestellt. Jeweils 1 mL Stammlösung und 500 μ L Harz wurden mit 1,7 μ L DIPEA (10 μ mol) versetzt und über Nacht unter Bewegung zur Reaktion gebracht. Nach 16 h wurde das Harz für 3 min bei 5.000 rpm zentrifugiert, der Überstand entfernt und aufbewahrt. Daraufhin wurde das Harz mit dreimal jeweils 950 μ L DMF gewaschen. Die Überstände und Waschlösungen wurden danach vereinigt und aufkonzentriert, um die Umsetzung mittels Protonen-NMR zu überprüfen. 950 μ L wässrige Ethanolaminlösung (1M) wurden jedem Röhrchen hinzugefügt, das Harz für eine Stunde geschüttelt, zentrifugiert und der Überstand verworfen. Abschließend wurden die Kügelchen mit 950 μ L H₂O gewaschen und bei 4 °C in 2%iger Natriumazidlösung gelagert.

Vor jeder Anreicherung wurden der Inkubationspuffer (25 mM HEPES, pH 7,4, 100 mM KCl), der Waschpuffer (1 mM Pi in Inkubationspuffer) und der Elutionspuffer (5 mM PPi in Inkubationspuffer) frisch hergestellt. Die Beladung des Harzes wurde mit Protonen-NMR auf 1,0 bis 1,7 μ mol/mL eingestellt. Alle folgenden Schritte der Anreicherung wurden bei 4 °C durchgeführt: 200 μ L Zn-DPA-Brei (~200-300 nmol) wurden dreimal mit jeweils 500 μ L Waschlösung behandelt und für 2 min bei 11.000 rpm zentrifugiert. Danach wurde das Harz mit frisch hergestelltem ZnBr₂ (10 mM in Inkubationspuffer) beladen, zentrifugiert und der Überstand verworfen. Als nächstes wurde das Harz zweimal mit jeweils 950 μ L Inkubationspuffer gewaschen, zentrifugiert und der Überstand verworfen. Ca. 1,8 mg Peptide, aufgenommen in Inkubationspuffer, wurden mit 200-300 nmol Harz für eine Stunde geschüttelt, für 2 min bei 11.000 rpm zentrifugiert und der Überstand mit den unphosphorylierten Peptiden aufbewahrt. Danach erfolgte das Waschen mit Inkubationspuffer (2 x 950 μ L), Zentrifugation und das Verwerfen des Überstandes. Monophosphorylierte Peptide wurden zweimal durch zehn minütiges Inkubieren mit 500 μ L Pi (1mM) und Zentrifugation von dem Harz gewaschen. Abschließend wurden pyrophosphorylierte und multipel phosphorylierte Peptide, durch zehn minütiges Waschen des Zn-DPA-Reagenzes mit 500 μ L PPi Elutionspuffer (5 mM) und Zentrifugation bei 11.000 rpm für 2 min, eluiert. Dieser Vorgang wurde noch einmal wiederholt und beide Eluate vereinigt.

Zum Entsalzen der Peptide wurde die Lösung mit konzentrierter Ameisensäure auf einen pH-Wert <2 gebracht. Parallel dazu wurde eine Oasis™ HLB Kartusche (10 mg, Waters) mit jeweils 1 ml MeOH und H₂O konditioniert. Die Kartusche wurde anschließend mit der angesäuerten Probe beladen und die Peptide mit jeweils 1 ml H₂O und 1 mL 2%iger FA gewaschen. Für die Elution der Peptide wurde ein Gemisch aus 5% NH₃ in 45% H₂O in 50% ACN verwendet. Zuletzt wurde das Eluat gefriergetrocknet, um die pyrophosphorylierten Peptide zu erhalten. Für die LC-MS-Analyse wird der Rückstand in H₂O aufgenommen.

Für die massenspektrometrische Analyse der Proben wurden die in Kapitel 5.7.4 vorgestellte Neutralverlust getriggerte ETHCD-Methode verwandt. Die Auswertung der massenspektrometrischen Rohdaten erfolgte nach der in Kapitel 5.8.3 beschriebenen Vorgehensweise.

5.8.2 Identifizierung endogener Proteinpyrophosphorylierungen in HEK293 Zellen

5.8.2.1 Kultivierung und Zelllyse von HEK293 Zellen

Die Herstellung des Zelllysats, die Reduktion und Alkylierung der Proteine und die Entsalzung der Peptide wurden nach einem Protokoll von Villén und Gygi durchgeführt.¹¹¹ Vier 5 cm Platten HEK 293 Zellen in DMEM (FBS, penstrep, gluta.) bei 60-70% Konfluenz wurden in 15 cm Platten gesplittet und vier Tage lang kultiviert. Parallel dazu wurden 100 mL Lysispuffer (8 M Harnstoff, 75 mM NaCl, 50 mM Tris (pH=8,2), 1 mM NaF, 1 mM β -Glycerophosphat, 1 mM Natriumorthovanadat, 10 mM Pyrophosphat & 1 mM PMSF) ohne Zusatz von Proteaseinhibitor hergestellt und in 10 mL Aliquote aufgeteilt. Nach vier Tagen entsprach die Konfluenz jeder Platte ca. 95%. Ein Aliquot des Lysispuffers wurde mit EDTA-freiem Proteaseinhibitor cOmplete™ (Roche, Basel) versetzt. Nach der Kultivierung wurde das Medium entfernt und die Zellen mit 5 mL PBS gewaschen, mit 5 mL Trypsin abgelöst und mit 10 mL DMEM gequentscht. Drei Kulturen wurden ausgezählt und eine mittlere Zelldichte von $7,28 \times 10^6/\text{ml}$, $8,28 \times 10^6/\text{ml}$ and $7,88 \times 10^6/\text{ml}$ ermittelt. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert und der Überstand verworfen. Der Rückstand wurde in 4 mL PBS aufgenommen und fünf der zehn Proben miteinander vereinigt, sodass sich fünf Proben ergaben. Die Zellsuspension wurde wiederrum zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurden 2 mL Lysispuffer jedem Röhrchen hinzugefügt, die Probe gevortext und für 4 min auf Eis abgekühlt. Danach wurde die Probe 3 x 1 min einer Ultraschallbehandlung unterzogen. Zellbruchstücke wurden durch Zentrifugation mit 2.500 g für 10 min entfernt. Der Überstand wurde gesammelt und mittels Pierce BCA Kit (Thermo Fisher Scientific) ein Proteingehalt von ca. 100 mg bestimmt.

Im nächsten Schritt wurden die Proteine mit 5 mM DTT auf ein 1 mL Aliquot Lysat für 25 min bei 56°C reduziert. Danach wurde der Überstand abgenommen und 14 mM Iodacetamid je Aliquot hinzugefügt und die Proteine für 30 min unter Ausschluss von Licht alkylt. Abschließend wurde die Pro-

be auf eine finale Konzentration von 10 mM DTT gebracht und für 15 min in der Dunkelheit inkubiert. Danach wurden die Proben in einem Verhältnis von 1:5 mit 25 mM Trispuffer pH=8,0 verdünnt und 1 mM CaCl₂ sowie sequencing grade modified Trypsin (Promega) in einem Verhältnis von 1:50 hinzugefügt. Der Verdau erfolgte über Nacht bei 37°C unter Schütteln.

Die Peptide wurden mit TFA auf eine finale Konzentration von 0,4% angesäuert, für 10 min bei 2500 g zentrifugiert und Zellbruchstücke entfernt. Parallel dazu wurden 500 mg Waters C₁₈ SepPak™ Kartuschen mit 7,5 mL ACN und 2,5 mL 50% ACN in 0,5% iger AcOH gewaschen. Die Kartusche wurde anschließend mit 0,1% TFA äquilibriert und mit den tryptischen Peptiden beladen. Danach wurde die Kartusche mit 7,5 mL 0,1% TFA-Lösung gewaschen. Das Gegenion wurde in einem finalen Waschschritt mit 900 µL 0,5% iger AcOH ausgetauscht und die Peptide mit 3 x 2 mL ACN eluiert. Die gesammelten Fraktionen wurden unter Gefriertrocknung eingeengt.

5.8.2.2 Anreicherung mit Zn-DPA-Komplex

Vor Beginn der Anreicherung wurden Inkubationspuffer (25 mM HEPES, pH 7,4, 100 mM KCl), Waschpuffer (1 mM Pi in Inkubationspuffer) und Elutionspuffer (5 mM PPi in Inkubationspuffer) frisch vorbereitet und die Beladung des Harzes (1,0 bis 1,7 µmol/mL) mit Proton NMR bestimmt. Alle Anreicherungsschritte wurden bei 4°C durchgeführt. 200 µL (ca. 200-300 nmol) des Zn-DPA-Harzes wurden in ein Eppendorfröhrchen überführt, mit Inkubationspuffer (3 x 500 µL) gewaschen und bei 3.000 g für 3 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Danach wurde das Harz mit einer frisch hergestellten ZnBr₂-Lösung (10 mM, 26,1 mg in 10 mL Inkubationspuffer) für 10 min unter Schütteln beladen. Daraufhin wurde das Gemisch kurz zentrifugiert und der Überstand verworfen. Im Anschluss wurde das Harz mit Inkubationspuffer (2 x 950 µL) behandelt, zentrifugiert und der Überstand verworfen. 1 mL tryptischer Peptide (ca. 1,8 mg/mL), aufgenommen in Inkubationspuffer, wurde dem Harz hinzugefügt und eine Stunde geschüttelt. Danach wurden die Kügelchen für 3 min bei 3000 g zentrifugiert und der Überstand, welcher unphosphorylierte Peptide enthält, abgenommen. Unspezifisch gebundene Peptide wurden durch Waschen mit Inkubationspuffer (2 x 950 µL) und Zentrifugation abgetrennt. Als nächstes wurden 3 x 500 µL Pi Waschpuffer (1 mM) hinzugefügt und die Proben für 10 min geschüttelt. Nach Zentrifugation wurden die Überstände abgenommen und gesammelt. Die Elution pyrophosphorylierter Peptide erfolgte durch zweifache Zugabe von 500 µL 5 mM PPi-Lösung und Schütteln für 10 min. Nach Zentrifugation für 3 min mit 3.000 g erhielt man einen Überstand, der aufbewahrt wurde. Der Elutionsschritt wurde ein weiteres Mal wiederholt.

Die vereinigten Eluate wurden mit 10%iger FA angesäuert (pH<2) und damit eine 1 cc Oasis™ HLB Kartusche (Waters) beladen. Zuvor wurde diese Kartusche mit 1 mL MeOH gewaschen und mit 1 mL H₂O äquilibriert. Die beladene Kartusche wurde mit 1 mL 5%iger FA gewaschen und die Peptide im Anschluss mit 1 mL 5%iger NH₃-Lösung in 50% MeOH eluiert.

5.8.2.3 Anreicherung von Phosphopeptiden mit IMAC-Beads

Zusätzlich wurden IMAC-Anreicherungen mit PHOS-Select™ Iron Affinity Gel beads (Sigma Aldrich, Allentown, USA) durchgeführt. Dazu wurden 400 µL der IMAC-Kügelchen mit 1,2 mL Bindungspuffer (40% ACN & 25 mM FA) gewaschen. Danach wurden die Kügelchen für 30 s bei 10.000 rpm zentrifugiert und der Überstand entfernt. Dieses Waschen der Beads wurde dreimal wiederholt. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Kügelchen in 400 µL Bindungspuffer aufgenommen, sodass ein Brei mit einem Gesamtvolumen von 800 µL entstand. Die gewaschenen Beads wurden anschließend mit den tryptischen Peptiden, welche in 1 mL Bindungspuffer gelöst waren, beladen. Für die Bindung wurden die Proben für 1 h geschüttelt. Im Anschluss wurde das Gemisch für 2 min bei 10.000 rpm zentrifugiert und der Überstand, welcher die unphosphorylierten Peptide enthielt, entfernt. Um unspezifisch gebundene Peptide zu entfernen wurden die Kügelchen dreimal mit 1,2 mL Bindungspuffer gewaschen. Die Elution der immobilisierten Peptide erfolgte mit zweimal 500 µL Elutionspuffer (50 mM K₂HPO₄, pH=10). Die eluierten Fraktionen wurden vereinigt und für die Entsalzung mit Oasis HLB Säulen mit 10% Ameisensäure auf einen pH-Wert <2 gebracht. Die finale Präparation der Proben erfolgte wie in Kapitel 5.8.1.2 beschrieben.

5.8.2.4 SAX-Fraktionierung angereicherter Peptide

Die aus den verschiedenen Anreicherungsverfahren stammenden Peptide wurden teilweise einer Fraktionierung mittels SAX-Chromatographie unterzogen. Für die Fraktionierung stand eine Agilent Infinity™ 1260 HPLC mit Fraktionssammler (Santa Clara, USA) zur Verfügung. Gesteuert wurde die Anlage mit der Software ChemStation™ Open LAB CDS Version 1.9.0. Als stationäre Phase wurde eine IonPac™ AS-24 SAX-Säule 250 x 2.2 mm von Thermo Fisher Scientific verwendet. Die mobile Phase bestand aus Puffer A (20 mM Ammoniumformiat & 20% ACN) und Puffer B (1 M Ammoniumformiat & 1% ACN). Beide Komponenten wurden in folgendem Gradienten eingesetzt:

Tabelle 15: Gradient der SAX zur Fraktionierung von pyrophosphorylierten Peptiden.

Zeit (min)	Flussrate (ml/min)	Puffer A (%)	Puffer B (%)
0-5	0,2	100	0
5-65	0,2	50	50
65-85	0,2	0	100
85-100	0,2	0	100
100-101	0,2	100	0
101-105	0,2	100	0

Von Beginn an bis zu einer Retentionszeit von 105 min wurde für jeweils fünf Minuten eine Fraktion gesammelt, sodass sich insgesamt 21 Fraktionen mit einem Volumen von jeweils 1 mL ergaben. Die erhaltenen Fraktionen wurden gefriergetrocknet und anschließend für die Messung in Wasser aufgenommen.

5.8.2.5 Neutralverlustgetriggerte EThcD/HCD-Experimente

Vor der Messung der Fraktionen wurde das komplette chromatographische System, inklusive Trappingsäule und analytischer Trennsäule, mit 0,1% iger Zitronensäure in 1% ACN gespült, um möglicherweise im System enthaltene Kationen (wie zum Beispiel Fe^{2+}) zu chelatisieren und zu entfernen. Unter Verwendung des im Kapitel 5.2.2 beschriebenen nanoLC-MS-Systems wurden neutralverlustgetriggerte EThcD/HCD-Experimente durchgeführt: FTMS-Übersichtsspektren wurden in einem Bereich von 350 bis 1500 m/z bei einer Auflösung von 60.000 aufgezeichnet. Auf die Verwendung der EASY-IC-Funktion wurde verzichtet. Um den AGC-Targetwert von 4×10^5 zu erreichen, wurde eine maximale Injektionszeit von 50 ms zugelassen. Die monoisotopischen Spezies von zwei bis vierfach geladenen Precursorionen wurden für die Fragmentierung ausgewählt, wobei Vorläuferionen mit hohem Ladungszustand bevorzugt fragmentiert wurden. Als Intensitätsschwellwert wurde 5×10^4 festgelegt. Die Vorläuferionen wurden mit einem massenselektiven Quadrupol innerhalb eines Isolationsfensters von 1.6 m/z isoliert. Um eine wiederholte Fragmentierung hochabundanter Precursorionen zu verhindern, wurde eine dynamische Ausschlusszeit von 20 s eingesetzt. CID MS/MS Spektren wurden mit einer normalisierten Kollisionsenergie 25% und einem AGC-Targetwert von 1×10^4 durchgeführt. Für die Isolierung der Vorläuferionen standen 100 ms zur Verfügung. Die generierten Fragmentationen wurden mit einem Auflösungsvermögen von 15.000 als centroidale Daten aufgezeichnet. Sobald der Neutralverlust von 177,943 Da mit einer relativen Abundanz $\geq 15\%$ innerhalb eines Massenfehlers von ± 20 ppm auftrat, wurden zusätzliche EThcD und HCD Fragmentationspektren des gleichen Precursorions aufgezeichnet. Für die getriggerte EThcD Fragmentierung wurde eine maximale Injektionszeit von 2000 ms bei einem AGC-Targetwert von 1×10^5 zugelassen. Die generierten EThcD-Fragmentenspektren wurden in der Orbitrap-Zelle mit einem Auflösungsvermögen von 60.000 und einem m/z -Bereich von 200-3000 als profile Daten detektiert. Für den ETD-Prozess wurden kalibrierte, ladungsabhängige ETD-Parameter verwendet und eine zusätzliche HCD Aktivierung von 30% zugelassen. Das getriggerte HCD-Spektrum wurde mit einem Targetwert von 5×10^4 , einer maximalen Injektionszeit von 500 ms, einer normalisierten Kollisionsenergie von 30% und einer Auflösung von 30.000 (FWHM) aufgezeichnet.

5.8.3 Datenbankgestützte Auswertung zur Identifizierung von Pyrophosphorylierungen

Die MS Rohdaten wurden mit Proteome Discoverer™ Version 2.2 (Thermo Fisher Scientific) analysiert und ausgewertet. Im Spektrumselektor wurden ausschließlich EThcD und HCD Spektren für die weitere Auswertung herangezogen. Zur Vereinfachung der komplexen EThcD Spektren wurde der Nichtfragmentationenfilter mit folgenden Parameter eingesetzt: Precursorionen und ladungsreduzierte Precursorionen wurden innerhalb eines Massenfensters von 4 Da entfernt. Darüber hinaus wurden Signale, welche von Neutralverlusten stammten, in einem Massenbereich von 2 Da von der Analyse ausgeschlossen. Die Fragmentationenspektren wurden danach entweder gegen die Proteomdatenbank von *S. cerevisiae* oder die humane Proteomdatenbank mit Hilfe des Suchalgorithmus Sequest HT™ gesucht. Bis zu zwei Fehlsplattstellen wurden zugelassen und Trypsin als Protease ausgewählt. Als Massentoleranz für Vorläuferionen wurde 10 ppm gewählt und die Massenabweichung für Fragmentation durfte 0,02 Da betragen. Oxidationen von Methionin, Phosphorylierungen von Serin, Threonin und Tyrosin sowie Pyrophosphorylierungen von Serin und Threonin und Carbamidomethylierungen von Methionin wurden als variable Modifikationen gesucht. Die ermittelten Ergebnisse wurden zusätzlich mit dem Target Decoy PSM Validator und einer False discovery rate (FDR) von 0,01 auf Peptidlevel gefiltert. Zusätzlich wurden die EThcD und HCD-Spektren manuell evaluiert, wobei ein besonderes Augenmerk auf dem Ausmaß an Neutralverlusten, die Sequenzabdeckung des Peptides, die Verteilung der Ionenserien und das Signal zu Rauschverhältnis der einzelnen Fragmentationen gelegt wurde.

6 Literaturverzeichnis

1. Lipmann, F.A. & Levene, P.A. SERINEPHOSPHORIC ACID OBTAINED ON HYDROLYSIS OF VITELLINIC ACID. *J. Biol. Chem.* **98**, 109-114 (1932).
2. Cohen, P. The role of protein phosphorylation in human health and disease. The Sir Hans Krebs Medal Lecture. *Eur. J. Biochem.* **268**, 5001-5010 (2001).
3. Wavreille, A.S., Garaud, M., Zhang, Y. & Pei, D. Defining SH2 domain and PTP specificity by screening combinatorial peptide libraries. *Meth.* **42**, 207-219 (2007).
4. Johnson, L.N. & Lewis, R.J. Structural basis for control by phosphorylation. *Chem. Rev.* **101**, 2209-2242 (2001).
5. Walsh, C.T., Garneau-Tsodikova, S. & Gatto, G.J., Jr. Protein posttranslational modifications: the chemistry of proteome diversifications. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **44**, 7342-7372 (2005).
6. Cohen, P. The origins of protein phosphorylation. *Nat. Cell Biol.* **4**, E127-130 (2002).
7. Shabb, J.B. Physiological substrates of cAMP-dependent protein kinase. *Chem. Rev.* **101**, 2381-2411 (2001).
8. Manning, G., Whyte, D.B., Martinez, R., Hunter, T. & Sudarsanam, S. The protein kinase complement of the human genome. *Science* **298**, 1912-1934 (2002).
9. Jackson, M.D. & Denu, J.M. Molecular reactions of protein phosphatases--insights from structure and chemistry. *Chem. Rev.* **101**, 2313-2340 (2001).
10. Tarrant, M.K. & Cole, P.A. The chemical biology of protein phosphorylation. *Annu. Rev. Biochem.* **78**, 797-825 (2009).
11. Hunter, T. Signaling - 2000 and beyond. *Cell* **100**, 113-127 (2000).
12. Schindler, T. et al. Structural mechanism for STI-571 inhibition of abelson tyrosine kinase. *Science* **289**, 1938-1942 (2000).
13. Kurzrock, R., Kantarjian, H.M., Druker, B.J. & Talpaz, M. Philadelphia chromosome-positive leukemias: from basic mechanisms to molecular therapeutics. *Ann. Intern. Med.* **138**, 819-830 (2003).

14. Kurzrock, R. et al. A novel c-abl protein product in Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* **325**, 631-635 (1987).
15. Mann, M. et al. Analysis of protein phosphorylation using mass spectrometry: deciphering the phosphoproteome. *Trends Biotechnol.* **20**, 261-268 (2002).
16. Olsen, J.V. et al. Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell* **127**, 635-648 (2006).
17. Leonard, P.G., Golemi-Kotra, D. & Stock, A.M. Phosphorylation-dependent conformational changes and domain rearrangements in *Staphylococcus aureus* VraR activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 8525-8530 (2013).
18. Trentini, D.B. et al. Arginine phosphorylation marks proteins for degradation by a Clp protease. *Nature* **539**, 48-53 (2016).
19. Hindupur, S.K. et al. The protein histidine phosphatase LHPP is a tumour suppressor. *Nature* **555**, 678-682 (2018).
20. Besant, P.G., Attwood, P.V. & Piggott, M.J. Focus on phosphoarginine and phospholysine. *Curr. Protein Pept. Sci.* **10**, 536-550 (2009).
21. Fuhrmann, J. et al. McsB Is a Protein Arginine Kinase That Phosphorylates and Inhibits the Heat-Shock Regulator CtsR. *Science* **324**, 1323-1327 (2009).
22. Sun, F. et al. Protein cysteine phosphorylation of SarA/MgrA family transcriptional regulators mediates bacterial virulence and antibiotic resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 15461-15466 (2012).
23. Bhandari, R. et al. Protein pyrophosphorylation by inositol pyrophosphates is a posttranslational event. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 15305-15310 (2007).
24. Boyer, P.D., Deluca, M., Ebner, K.E., Hultquist, D.E. & Peter, J.B. Identification of phosphohistidine in digests from a probable intermediate of oxidative phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **237**, Pc3306-pc3308 (1962).
25. Kee, J.-M. & Muir, T.W. Chasing Phosphohistidine, an Elusive Sibling in the Phosphoamino Acid Family. *ACS Chem. Biol.* **7**, 44-51 (2012).
26. Potel, C.M., Lin, M.H., Heck, A.J.R. & Lemeer, S. Widespread bacterial protein histidine phosphorylation revealed by mass spectrometry-based proteomics. *Nat. Meth.* (2018).

27. Walinder, O. Evidence of the presence of 1-phosphohistidine as the main phosphohistidine as the main phosphorylated component at the active site of bovine liver nucleoside diphosphate kinase. *Acta Chem Scand* **23**, 339-341 (1969).
28. Wakim, B.T., Grutkoski, P.S., Vaughan, A.T. & Engelmann, G.L. Stimulation of a Ca(2+)-calmodulin-activated histone 3 arginine kinase in quiescent rat heart endothelial cells compared to actively dividing cells. *J. Biol. Chem.* **270**, 23155-23158 (1995).
29. Chen, C.C. et al. PHOSPHORYLATION OF NUCLEAR PROTEINS IN RAT REGENERATING LIVER. *Biochem.* **16**, 4852-4855 (1977).
30. Besant, P.G. & Attwood, P.V. Detection of a mammalian histone H4 kinase that has yeast histidine kinase-like enzymic activity. *Int J Biochem Cell Biol* **32**, 243-253 (2000).
31. Gemmecker, G. et al. Glucose transporter of Escherichia coli: NMR characterization of the phosphocysteine form of the IIB(Glc) domain and its binding interface with the IIA(Glc) subunit. *Biochem.* **36**, 7408-7417 (1997).
32. Trumbore, M.W., Wang, R.H., Enkemann, S.A. & Berger, S.L. Prothymosin alpha in vivo contains phosphorylated glutamic acid residues. *J. Biol. Chem.* **272**, 26394-26404 (1997).
33. Brandao, T.A., Hengge, A.C. & Johnson, S.J. Insights into the reaction of protein-tyrosine phosphatase 1B: crystal structures for transition state analogs of both catalytic steps. *J. Biol. Chem.* **285**, 15874-15883 (2010).
34. Hauser, A., Penkert, M. & Hackenberger, C.P.R. Chemical Approaches to Investigate Labile Peptide and Protein Phosphorylation. *Acc. Chem. Res.* **50**, 1883-1893 (2017).
35. Elsholz, A.K. et al. Global impact of protein arginine phosphorylation on the physiology of *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 7451-7456 (2012).
36. Junker, S. et al. Spectral Library Based Analysis of Arginine Phosphorylations in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Cell. Proteomics* **17**, 335-348 (2018).
37. Zetterqvist, O. & Engstrom, L. Isolation of N-e-[32P]phosphoryl-lysine from rat-liver cell sap after incubation with [32P]adenosine triphosphate. *Biochim. Biophys. Acta* **141**, 523-532 (1967).
38. Ohmori, H., Kuba, M. & Kumon, A. Two phosphatases for 6-phospholysine and 3-phosphohistidine from rat brain. *J. Biol. Chem.* **268**, 7625-7627 (1993).

39. Asthagiri, D., Liu, T., Noodleman, L., Van Etten, R.L. & Bashford, D. On the role of the conserved aspartate in the hydrolysis of the phosphocysteine intermediate of the low molecular weight tyrosine phosphatase. *J. Amer. Chem. Soc.* **126**, 12677-12684 (2004).
40. Gulerez, I. et al. Phosphocysteine in the PRL-CNNM pathway mediates magnesium homeostasis. *EMBO Rep.* **17**, 1890-1900 (2016).
41. Saiardi, A., Bhandari, R., Resnick, A.C., Snowman, A.M. & Snyder, S.H. Phosphorylation of proteins by inositol pyrophosphates. *Science* **306**, 2101-2105 (2004).
42. Azevedo, C., Burton, A., Ruiz-Mateos, E., Marsh, M. & Saiardi, A. Inositol pyrophosphate mediated pyrophosphorylation of AP3B1 regulates HIV-1 Gag release. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 21161-21166 (2009).
43. Bhandari, R., Juluri, K.R., Resnick, A.C. & Snyder, S.H. Gene deletion of inositol hexakisphosphate kinase 1 reveals inositol pyrophosphate regulation of insulin secretion, growth, and spermiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 2349-2353 (2008).
44. Chakraborty, A. et al. Inositol Pyrophosphates Inhibit Akt Signaling, Thereby Regulating Insulin Sensitivity and Weight Gain. *Cell* **143**, 897-910 (2010).
45. Illies, C. et al. Requirement of inositol pyrophosphates for full exocytotic capacity in pancreatic beta cells. *Science* **318**, 1299-1302 (2007).
46. Rao, F. et al. Inositol hexakisphosphate kinase-1 mediates assembly/disassembly of the CRL4-signalosome complex to regulate DNA repair and cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 16005-16010 (2014).
47. Ghosh, S. et al. Inositol hexakisphosphate kinase 1 maintains hemostasis in mice by regulating platelet polyphosphate levels. *Blood* **122**, 1478-1486 (2013).
48. Thota, S.G., Unnikannan, C.P., Thampatty, S.R., Manorama, R. & Bhandari, R. Inositol pyrophosphates regulate RNA polymerase I-mediated rRNA transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* **466**, 105-114 (2015).
49. Sziggyarto, Z., Garedew, A., Azevedo, C. & Saiardi, A. Influence of Inositol Pyrophosphates on Cellular Energy Dynamics. *Science* **334**, 802-805 (2011).
50. Wu, M., Chong, L.S., Perlman, D.H., Resnick, A.C. & Fiedler, D. Inositol polyphosphates intersect with signaling and metabolic networks via two distinct mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, E6757-e6765 (2016).

51. Shears, S. The long-awaited demonstration of protein pyrophosphorylation by IP7 in vivo? *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, E17; author reply E18 (2010).
52. Internetwebseite: Duden.de, URL: <https://www.duden.de/rechtschreibung/labil>, abgerufen: 11.08.18, 10:30 Uhr
53. Shizuta, Y., Beavo, J.A., Bechtel, P.J., Hofmann, F. & Krebs, E.G. Reversibility of adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase reactions. *J. Biol. Chem.* **250**, 6891-6896 (1975).
54. Hubler, L., Gill, G.N. & Bertics, P.J. Reversibility of the epidermal growth factor receptor self-phosphorylation reaction. Evidence for formation of a high energy phosphotyrosine bond. *J. Biol. Chem.* **264**, 1558-1564 (1989).
55. Wylie, D., Stock, A., Wong, C.Y. & Stock, J. Sensory transduction in bacterial chemotaxis involves phosphotransfer between Che proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **151**, 891-896 (1988).
56. Ruben, E.A., Chapman, M.S. & Evanseck, J.D. Generalized anomeric interpretation of the "high-energy" N-P bond in N-methyl-N'-phosphorylguanidine: importance of reinforcing stereoelectronic effects in "high-energy" phosphoester bonds. *J. Amer. Chem. Soc.* **127**, 17789-17798 (2005).
57. Sem, D.S. & Cleland, W.W. Phosphorylated aminosugars: synthesis, properties, and reactivity in enzymatic reactions. *Biochem.* **30**, 4978-4984 (1991).
58. Benkovic, S.J. & Sampson, E.J. Structure-reactivity correlation for the hydrolysis of phosphoramidate monoanions. *J. Amer. Chem. Soc.* **93**, 4009-4016 (1971).
59. Attwood, P.V., Piggott, M.J., Zu, X.L. & Besant, P.G. Focus on phosphohistidine. *Amino Acids* **32**, 145-156 (2007).
60. Bertran-Vicente, J. et al. Site-Specifically Phosphorylated Lysine Peptides. *J. Amer. Chem. Soc.* **136**, 13622-13628 (2014).
61. Bertran-Vicente, J. et al. Chemoselective synthesis and analysis of naturally occurring phosphorylated cysteine peptides. *Nat. Commun.* **7** (2016).
62. Yates, L.M. & Fiedler, D. Establishing the Stability and Reversibility of Protein Pyrophosphorylation with Synthetic Peptides. *Chembiochem.* **16**, 415-423 (2015).
63. Wei, Y.F. & Matthews, H.R. Identification of phosphohistidine in proteins and purification of protein-histidine kinases. *Methods Enzymol.* **200**, 388-414 (1991).

64. Fujitaki, J.M. et al. A simple preparation of N-phosphorylated lysine and arginine. *Prep. Biochem.* **10**, 205-213 (1980).
65. Beckman-Sundh, U., Ek, B., Zetterqvist, O. & Ek, P. A screening method for phosphohistidine phosphatase 1 activity. *Ups. J. Med. Sci.* **116**, 161-168 (2011).
66. Ek, P., Ek, B. & Zetterqvist, O. Phosphohistidine phosphatase 1 (PHPT1) also dephosphorylates phospholysine of chemically phosphorylated histone H1 and polylysine. *Ups. J. Med. Sci.* **120**, 20-27 (2015).
67. Fuhrmann, J. & Thompson, P.R. Protein Arginine Methylation and Citrullination in Epigenetic Regulation. *ACS Chem. Biol.* **11**, 654-668 (2016).
68. Hofmann, F.T. et al. A phosphoarginine containing peptide as an artificial SH2 ligand. *Chem. Commun.* **47**, 10335-10337 (2011).
69. Bertran-Vicente, J., Schuermann, M., Hackenberger, C.P.R. & Krause, E. Gas-Phase Rearrangement in Lysine Phosphorylated Peptides During Electron-Transfer Dissociation Tandem Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **87**, 6990-6994 (2015).
70. Bertran-Vicente, J., Schumann, M., Schmieder, P., Krause, E. & Hackenberger, C.P. Direct access to site-specifically phosphorylated-lysine peptides from a solid-support. *Org. Biomol. Chem.* **13**, 6839-6843 (2015).
71. Bernardes, G.J., Chalker, J.M., Errey, J.C. & Davis, B.G. Facile conversion of cysteine and alkyl cysteines to dehydroalanine on protein surfaces: versatile and switchable access to functionalized proteins. *J. Amer. Chem. Soc.* **130**, 5052-5053 (2008).
72. Chooi, K.P. et al. Synthetic Phosphorylation of p38 alpha Recapitulates Protein Kinase Activity. *J. Amer. Chem. Soc.* **136**, 1698-1701 (2014).
73. Meledin, R., Mali, S.M., Singh, S.K. & Brik, A. Protein ubiquitination via dehydroalanine: development and insights into the diastereoselective 1,4-addition step. *Org. Biomol. Chem.* **14**, 4817-4823 (2016).
74. Marmelstein, A.M., Yates, L.M., Conway, J.H. & Fiedler, D. Chemical Pyrophosphorylation of Functionally Diverse Peptides. *J. Amer. Chem. Soc.* **136**, 108-111 (2014).
75. Yates, L.M., Marmelstein, A.M. & Fiedler, D. Synthetic Pyrophosphorylation Methods and Their Use in Chemical Biology. *Synlett* **25**, 2239-2245 (2014).
76. Smith, L.M. & Kelleher, N.L. Proteoform: a single term describing protein complexity. *Nat. Meth.* **10**, 186-187 (2013).

77. Siuti, N. & Kelleher, N.L. Decoding protein modifications using top-down mass spectrometry. *Nat. Meth.* **4**, 817-821 (2007).
78. Tran, J.C. et al. Mapping intact protein isoforms in discovery mode using top-down proteomics. *Nature* **480**, 254-258 (2011).
79. Forbes, A.J., Mazur, M.T., Patel, H.M., Walsh, C.T. & Kelleher, N.L. Toward efficient analysis of >70 kDa proteins with 100% sequence coverage. *Proteomics* **1**, 927-933 (2001).
80. Cristobal, A. et al. Toward an Optimized Workflow for Middle-Down Proteomics. *Anal. Chem.* **89**, 3318-3325 (2017).
81. Catherman, A.D., Skinner, O.S. & Kelleher, N.L. Top Down proteomics: facts and perspectives. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **445**, 683-693 (2014).
82. Toby, T.K., Fornelli, L. & Kelleher, N.L. Progress in Top-Down Proteomics and the Analysis of Proteoforms. *Annu. Rev. Anal. Chem.* **9**, 499-519 (2016).
83. Tyanova, S. et al. The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nat. Meth.* **13**, 731-740 (2016).
84. Chick, J.M. et al. A mass-tolerant database search identifies a large proportion of unassigned spectra in shotgun proteomics as modified peptides. *Nat. Biotechnol.* **33**, 743-749 (2015).
85. Taus, T. et al. Universal and Confident Phosphorylation Site Localization Using phosphoRS. *J. Proteome Res.* **10**, 5354-5362 (2011).
86. Cox, J. & Mann, M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat. Biotechnol.* **26**, 1367-1372 (2008).
87. Dorfer, V. et al. MS Amanda, a universal identification algorithm optimized for high accuracy tandem mass spectra. *J. Proteome Res.* **13**, 3679-3684 (2014).
88. Aebersold, R. & Mann, M. Mass-spectrometric exploration of proteome structure and function. *Nature* **537**, 347-355 (2016).
89. Savitski, M.M. et al. Confident Phosphorylation Site Localization Using the Mascot Delta Score. *Mol. Cell. Proteomics* **10**, 12 (2011).
90. Chalkley, R.J. & Clauser, K.R. Modification Site Localization Scoring: Strategies and Performance. *Mol. Cell. Proteomics* **11**, 3-14 (2012).

91. MacLean, B. et al. Skyline: an open source document editor for creating and analyzing targeted proteomics experiments. *Bioinformatics* **26**, 966-968 (2010).
92. Kelstrup, C.D. et al. Performance Evaluation of the Q Exactive HF-X for Shotgun Proteomics. *J. Proteome Res.* **17**, 727-738 (2018).
93. Picotti, P. & Aebersold, R. Selected reaction monitoring-based proteomics: workflows, potential, pitfalls and future directions. *Nat. Meth.* **9**, 555-566 (2012).
94. Peterson, A.C., Russell, J.D., Bailey, D.J., Westphall, M.S. & Coon, J.J. Parallel reaction monitoring for high resolution and high mass accuracy quantitative, targeted proteomics. *Mol. Cell. Proteomics* **11**, 1475-1488 (2012).
95. Tsou, C.C. et al. DIA-Umpire: comprehensive computational framework for data-independent acquisition proteomics. *Nat. Meth.* **12**, 258-264, 257 p following 264 (2015).
96. Gillet, L.C. et al. Targeted data extraction of the MS/MS spectra generated by data-independent acquisition: a new concept for consistent and accurate proteome analysis. *Mol. Cell. Proteomics* **11**, O111.016717 (2012).
97. Rosenberger, G. et al. A repository of assays to quantify 10,000 human proteins by SWATH-MS. *Sci. Data* **1**, 140031 (2014).
98. Rost, H.L. et al. OpenSWATH enables automated, targeted analysis of data-independent acquisition MS data. *Nat. Biotechnol.* **32**, 219-223 (2014).
99. Meier, F. et al. Parallel Accumulation-Serial Fragmentation (PASEF): Multiplying Sequencing Speed and Sensitivity by Synchronized Scans in a Trapped Ion Mobility Device. *J. Proteome Res.* **14**, 5378-5387 (2015).
100. Shvartsburg, A.A., Singer, D., Smith, R.D. & Hoffmann, R. Ion mobility separation of isomeric phosphopeptides from a protein with variant modification of adjacent residues. *Anal. Chem.* **83**, 5078-5085 (2011).
101. Mann, M. Functional and quantitative proteomics using SILAC. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 952-958 (2006).
102. Kruger, M. et al. SILAC mouse for quantitative proteomics uncovers kindlin-3 as an essential factor for red blood cell function. *Cell* **134**, 353-364 (2008).
103. Udeshi, N.D., Compton, P.D., Shabanowitz, J., Hunt, D.F. & Rose, K.L. Methods for analyzing peptides and proteins on a chromatographic timescale by electron-transfer dissociation mass spectrometry. *Nat Protoc* **3**, 1709-1717 (2008).

104. Ross, P.L. et al. Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Mol. Cell. Proteomics* **3**, 1154-1169 (2004).
105. Thompson, A. et al. Tandem mass tags: a novel quantification strategy for comparative analysis of complex protein mixtures by MS/MS. *Anal. Chem.* **75**, 1895-1904 (2003).
106. Ting, L., Rad, R., Gygi, S.P. & Haas, W. MS3 eliminates ratio distortion in isobaric multiplexed quantitative proteomics. *Nat. Meth.* **8**, 937-940 (2011).
107. Ow, S.Y. et al. iTRAQ underestimation in simple and complex mixtures: "the good, the bad and the ugly". *J. Proteome Res.* **8**, 5347-5355 (2009).
108. Cox, J. et al. Accurate proteome-wide label-free quantification by delayed normalization and maximal peptide ratio extraction, termed MaxLFQ. *Mol. Cell. Proteomics* **13**, 2513-2526 (2014).
109. Ludwig, C., Claassen, M., Schmidt, A. & Aebersold, R. Estimation of absolute protein quantities of unlabeled samples by selected reaction monitoring mass spectrometry. *Mol. Cell. Proteomics* **11**, M111.013987 (2012).
110. Lemeer, S. & Heck, A.J. The phosphoproteomics data explosion. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **13**, 414-420 (2009).
111. Villen, J. & Gygi, S.P. The SCX/IMAC enrichment approach for global phosphorylation analysis by mass spectrometry. *Nat. Prot.* **3**, 1630-1638 (2008).
112. Thingholm, T.E., Jensen, O.N., Robinson, P.J. & Larsen, M.R. SIMAC (sequential elution from IMAC), a phosphoproteomics strategy for the rapid separation of monophosphorylated from multiply phosphorylated peptides. *Mol. Cell. Proteomics* **7**, 661-671 (2008).
113. Zhou, H. et al. Robust phosphoproteome enrichment using monodisperse microsphere-based immobilized titanium (IV) ion affinity chromatography. *Nat. Prot.* **8**, 461-480 (2013).
114. Li, Y. et al. Preparation of Fe₃O₄@ZrO₂ core-shell microspheres as affinity probes for selective enrichment and direct determination of phosphopeptides using matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *J. Proteome Res.* **6**, 4498-4510 (2007).
115. Li, Y. et al. Novel Fe₃O₄@TiO₂ core-shell microspheres for selective enrichment of phosphopeptides in phosphoproteome analysis. *J. Proteome Res.* **7**, 2526-2538 (2008).
116. Ma, W.F. et al. Tailor-Made Magnetic Fe₃O₄@mTiO(2) Microspheres with a Tunable Mesoporous Anatase Shell for Highly Selective and Effective Enrichment of Phosphopeptides. *ACS Nano* **6**, 3179-3188 (2012).

117. Thingholm, T.E., Jorgensen, T.J.D., Jensen, O.N. & Larsen, M.R. Highly selective enrichment of phosphorylated peptides using titanium dioxide. *Nat. Prot.* **1**, 1929-1935 (2006).
118. Tsai, C.F. et al. Sequential Phosphoproteomic Enrichment through Complementary Metal-Directed Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography. *Anal. Chem.* **86**, 685-693 (2014).
119. Lai, A.C., Tsai, C.F., Hsu, C.C., Sun, Y.N. & Chen, Y.J. Complementary Fe(3+)- and Ti(4+)-immobilized metal ion affinity chromatography for purification of acidic and basic phosphopeptides. *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* **26**, 2186-2194 (2012).
120. Sun, Z., Hamilton, K.L. & Reardon, K.F. Evaluation of quantitative performance of sequential immobilized metal affinity chromatographic enrichment for phosphopeptides. *Anal. Biochem.* **445**, 30-37 (2014).
121. Abelin, J.G. et al. Complementary IMAC enrichment methods for HLA-associated phosphopeptide identification by mass spectrometry. *Nat. Prot.* **10**, 1308-1318 (2015).
122. Fukuda, I. et al. Optimization of enrichment conditions on TiO₂ chromatography using glycerol as an additive reagent for effective phosphoproteomic analysis. *J. Proteome Res.* **12**, 5587-5597 (2013).
123. Zhao, X. et al. Citric acid-assisted two-step enrichment with TiO₂ enhances the separation of multi- and monophosphorylated peptides and increases phosphoprotein profiling. *J. Proteome Res.* **12**, 2467-2476 (2013).
124. Kanshin, E., Michnick, S.W. & Thibault, P. Displacement of N/Q-rich peptides on TiO₂ beads enhances the depth and coverage of yeast phosphoproteome analyses. *J. Proteome Res.* **12**, 2905-2913 (2013).
125. Vilasi, A., Fiume, I., Pace, P., Rossi, M. & Pocsfalvi, G. Enrichment specificity of micro and nano-sized titanium and zirconium dioxides particles in phosphopeptide mapping. *J. Mass Spectrom.* **48**, 1188-1198 (2013).
126. Matheron, L., van den Toorn, H., Heck, A.J. & Mohammed, S. Characterization of biases in phosphopeptide enrichment by Ti(4+)-immobilized metal affinity chromatography and TiO₂ using a massive synthetic library and human cell digests. *Anal. Chem.* **86**, 8312-8320 (2014).
127. Kettenbach, A.N. & Gerber, S.A. Rapid and reproducible single-stage phosphopeptide enrichment of complex peptide mixtures: application to general and phosphotyrosine-specific phosphoproteomics experiments. *Anal. Chem.* **83**, 7635-7644 (2011).

128. Di Palma, S. et al. Finding the same needles in the haystack? A comparison of phosphotyrosine peptides enriched by immuno-affinity precipitation and metal-based affinity chromatography. *J. Proteomics* **91**, 331-337 (2013).
129. Bergstrom Lind, S. et al. Toward a comprehensive characterization of the phosphotyrosine proteome. *Cell Signal.* **23**, 1387-1395 (2011).
130. Steen, H., Pandey, A., Andersen, J.S. & Mann, M. Analysis of tyrosine phosphorylation sites in signaling molecules by a phosphotyrosine-specific immonium ion scanning method. *Sci STKE* **2002**, pl16 (2002).
131. Basnet, H. et al. Tyrosine phosphorylation of histone H2A by CK2 regulates transcriptional elongation. *Nature* **516**, 267-+ (2014).
132. Kee, J.M., Oslund, R.C., Perlman, D.H. & Muir, T.W. A pan-specific antibody for direct detection of protein histidine phosphorylation. *Nat. Chem. Biol.* **9**, 416-U428 (2013).
133. Kee, J.M., Oslund, R.C., Couvillon, A.D. & Muir, T.W. A second-generation phosphohistidine analog for production of phosphohistidine antibodies. *Org. Lett.* **17**, 187-189 (2015).
134. Lilley, M., Mambwe, B., Thompson, M.J., Jackson, R.F. & Muimo, R. 4-Phosphopyrazol-2-yl alanine: a non-hydrolysable analogue of phosphohistidine. *Chem. Commun.* **51**, 7305-7308 (2015).
135. Kee, J.M., Villani, B., Carpenter, L.R. & Muir, T.W. Development of stable phosphohistidine analogues. *J. Amer. Chem. Soc.* **132**, 14327-14329 (2010).
136. Fuhs, S.R. et al. Monoclonal 1- and 3-Phosphohistidine Antibodies: New Tools to Study Histidine Phosphorylation. *Cell* **162**, 198-210 (2015).
137. Fuhs, S.R. & Hunter, T. pHisphorylation: the emergence of histidine phosphorylation as a reversible regulatory modification. *Curr. Opin. Cell Biol.* **45**, 8-16 (2017).
138. Panda, S. et al. Identification of PGAM5 as a Mammalian Protein Histidine Phosphatase that Plays a Central Role to Negatively Regulate CD4(+) T Cells. *Mol. Cell.* **63**, 457-469 (2016).
139. Srivastava, S. et al. Histidine phosphorylation relieves copper inhibition in the mammalian potassium channel KCa3.1. *Elife* **5** (2016).
140. Fuhrmann, J., Subramanian, V. & Thompson, P.R. Synthesis and Use of a Phosphonate Amidine to Generate an Anti-Phosphoarginine-Specific Antibody. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **54**, 14715-14718 (2015).

141. Ouyang, H. et al. Development of a stable phosphoarginine analog for producing phosphoarginine antibodies. *Org. Biomol. Chem.* **14**, 1925-1929 (2016).
142. Trentini, D.B., Fuhrmann, J., Mechtler, K. & Clausen, T. Chasing Phosphoarginine Proteins: Development of a Selective Enrichment Method Using a Phosphatase Trap. *Mol. Cell. Proteomics* **13**, 1953-1964 (2014).
143. Conway, J.H. & Fiedler, D. An Affinity Reagent for the Recognition of Pyrophosphorylated Peptides. *Angew. Chem. Int. Edit. Engl.* **54**, 3941-3945 (2015).
144. Aebersold, R. & Mann, M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* **422**, 198-207 (2003).
145. Wolters, D.A., Washburn, M.P. & Yates, J.R., 3rd An automated multidimensional protein identification technology for shotgun proteomics. *Anal. Chem.* **73**, 5683-5690 (2001).
146. Link, A.J. et al. Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry. *Nat. Biotechnol.* **17**, 676-682 (1999).
147. Han, D.K., Eng, J., Zhou, H. & Aebersold, R. Quantitative profiling of differentiation-induced microsomal proteins using isotope-coded affinity tags and mass spectrometry. *Nat. Biotechnol.* **19**, 946-951 (2001).
148. Di Palma, S., Hennrich, M.L., Heck, A.J.R. & Mohammed, S. Recent advances in peptide separation by multidimensional liquid chromatography for proteome analysis. *J. Proteomics* **75**, 3791-3813 (2012).
149. Gilar, M., Olivova, P., Daly, A.E. & Gebler, J.C. Two-dimensional separation of peptides using RP-RP-HPLC system with different pH in first and second separation dimensions. *J. Sep. Sci.* **28**, 1694-1703 (2005).
150. Lombardi, B., Rendell, N., Edwards, M., Katan, M. & Zimmermann, J.G. Evaluation of phosphopeptide enrichment strategies for quantitative TMT analysis of complex network dynamics in cancer-associated cell signalling. *EuPA Open Proteom.* **6**, 10-15 (2015).
151. Hennrich, M.L., van den Toorn, H.W., Groenewold, V., Heck, A.J. & Mohammed, S. Ultra acidic strong cation exchange enabling the efficient enrichment of basic phosphopeptides. *Anal. Chem.* **84**, 1804-1808 (2012).
152. Dong, M. et al. Depletion of acidic phosphopeptides by SAX to improve the coverage for the detection of basophilic kinase substrates. *J. Proteome Res.* **11**, 4673-4681 (2012).
153. Zhou, H. et al. Toward a comprehensive characterization of a human cancer cell phosphoproteome. *J. Proteome Res.* **12**, 260-271 (2013).

154. Engholm-Keller, K. et al. TiSH--a robust and sensitive global phosphoproteomics strategy employing a combination of TiO₂, SIMAC, and HILIC. *J. Proteomics* **75**, 5749-5761 (2012).
155. Zarei, M., Sprenger, A., Rackiewicz, M. & Dengjel, J. Fast and easy phosphopeptide fractionation by combinatorial ERLIC-SCX solid-phase extraction for in-depth phosphoproteome analysis. *Nat. Prot.* **11**, 37-45 (2016).
156. Loroach, S., Zahedi, R.P. & Sickmann, A. Highly Sensitive Phosphoproteomics by Tailoring Solid-Phase Extraction to Electrostatic Repulsion-Hydrophilic Interaction Chromatography. *Anal. Chem.* **87**, 1596-1604 (2015).
157. Loroach, S., Schommartz, T., Brune, W., Zahedi, R.P. & Sickmann, A. Multidimensional electrostatic repulsion-hydrophilic interaction chromatography (ERLIC) for quantitative analysis of the proteome and phosphoproteome in clinical and biomedical research. *Biochim. Biophys. Acta* **1854**, 460-468 (2015).
158. Alpert, A.J., Hudecz, O. & Mechtler, K. Anion-exchange chromatography of phosphopeptides: weak anion exchange versus strong anion exchange and anion-exchange chromatography versus electrostatic repulsion-hydrophilic interaction chromatography. *Anal. Chem.* **87**, 4704-4711 (2015).
159. Erickson, B.K. et al. Evaluating Multiplexed Quantitative Phosphopeptide Analysis on a Hybrid Quadrupole Mass Filter/Linear Ion Trap/Orbitrap Mass Spectrometer. *Anal. Chem.* **87**, 1241-1249 (2015).
160. Batth, T.S. & Olsen, J.V. in *Phospho-Proteomics: Methods and Protocols*, 2nd Edition, Vol. 1355. (ed. L. VonStechow) 179-192 (Humana Press Inc, Totowa; 2016).
161. Batth, T.S., Francavilla, C. & Olsen, J.V. Off-Line High-pH Reversed-Phase Fractionation for In-Depth Phosphoproteomics. *J. Proteome Res.* **13**, 6176-6186 (2014).
162. Gilar, M. et al. Comparison of 1-D and 2-D LC MS/MS methods for proteomic analysis of human serum. *Electrophoresis* **30**, 1157-1167 (2009).
163. Delmotte, N., Lasaosa, M., Tholey, A., Heinzle, E. & Huber, C.G. Two-dimensional reversed-phase x ion-pair reversed-phase HPLC: An alternative approach to high-resolution peptide separation for shotgun proteome analysis. *J. Proteome Res.* **6**, 4363-4373 (2007).
164. Toll, H., Oberacher, H., Swart, R. & Huber, C.G. Separation, detection, and identification of peptides by ion-pair reversed-phase high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry at high and low pH. *J. Chromatogr. A* **1079**, 274-286 (2005).

165. Dwivedi, R.C. et al. Practical implementation of 2D HPLC scheme with accurate peptide retention prediction in both dimensions for high-throughput bottom-up proteomics. *Anal. Chem.* **80**, 7036-7042 (2008).
166. Wang, Y.X. et al. Reversed-phase chromatography with multiple fraction concatenation strategy for proteome profiling of human MCF10A cells. *Proteomics* **11**, 2019-2026 (2011).
167. Roepstorff, P. & Fohlman, J. Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomed. Mass Spectrom.* **11**, 601 (1984).
168. Brodbelt, J.S. Ion Activation Methods for Peptides and Proteins. *Anal. Chem.* **88**, 30-51 (2016).
169. McLuckey, S.A. Principles of collisional activation in analytical mass spectrometry. *J. Amer. Soc. Mass Spectrom.* **3**, 599-614 (1992).
170. Paizs, B. & Suhai, S. Fragmentation pathways of protonated peptides. *Mass Spectrom. Rev.* **24**, 508-548 (2005).
171. Olsen, J.V. et al. Higher-energy C-trap dissociation for peptide modification analysis. *Nat. Meth.* **4**, 709-712 (2007).
172. Bythell, B.J., Suhai, S., Somogyi, A. & Paizs, B. Proton-driven amide bond-cleavage pathways of gas-phase peptide ions lacking mobile protons. *J. Amer. Chem. Soc.* **131**, 14057-14065 (2009).
173. Wysocki, V.H., Tsaprailis, G., Smith, L.L. & Brei, L.A. Mobile and localized protons: a framework for understanding peptide dissociation. *J. Mass Spectrom.* **35**, 1399-1406 (2000).
174. Palumbo, A.M. & Reid, G.E. Evaluation of Gas-Phase Rearrangement and Competing Fragmentation Reactions on Protein Phosphorylation Site Assignment Using Collision Induced Dissociation-MS/MS and MS3. *Anal. Chem.* **80**, 9735-9747 (2008).
175. Beausoleil, S.A. et al. Large-scale characterization of HeLa cell nuclear phosphoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 12130-12135 (2004).
176. Ulintz, P.J. et al. Comparison of MS2-Only, MSA, and MS2/MS3 Methodologies for Phosphopeptide Identification. *J. Proteome Res.* **8**, 887-899 (2009).
177. Schroeder, M.J., Shabanowitz, J., Schwartz, J.C., Hunt, D.F. & Coon, J.J. A neutral loss activation method for improved phosphopeptide sequence analysis by quadrupole ion trap mass spectrometry. *Anal. Chem.* **76**, 3590-3598 (2004).

178. Nagaraj, N., D'Souza, R.C.J., Cox, J., Olsen, J.V. & Mann, M. Feasibility of Large-Scale Phosphoproteomics with Higher Energy Collisional Dissociation Fragmentation. *J. Proteome Res.* **9**, 6786-6794 (2010).
179. Salek, M., Alonso, A., Pipkorn, R. & Lehmann, W.D. Analysis of protein tyrosine phosphorylation by nanoelectrospray ionization high-resolution tandem mass spectrometry and tyrosine-targeted product ion scanning. *Anal. Chem.* **75**, 2724-2729 (2003).
180. Zubarev, R.A. et al. Electron capture dissociation for structural characterization of multiply charged protein cations. *Anal. Chem.* **72**, 563-573 (2000).
181. Zubarev, R.A., Kelleher, N.L. & McLafferty, F.W. Electron Capture Dissociation of Multiply Charged Protein Cations. A Nonergodic Process. *J. Amer. Chem. Soc.* **120**, 3265-3266 (1998).
182. Zubarev, R.A. Reactions of polypeptide ions with electrons in the gas phase. *Mass Spectrom. Rev.* **22**, 57-77 (2003).
183. Cooper, H.J., Hakansson, K. & Marshall, A.G. The role of electron capture dissociation in biomolecular analysis. *Mass Spectrom. Rev.* **24**, 201-222 (2005).
184. Syka, J.E., Coon, J.J., Schroeder, M.J., Shabanowitz, J. & Hunt, D.F. Peptide and protein sequence analysis by electron transfer dissociation mass spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 9528-9533 (2004).
185. Coon, J.J., Shabanowitz, J., Hunt, D.F. & Syka, J.E. Electron transfer dissociation of peptide anions. *J. Amer. Soc. Mass Spectrom.* **16**, 880-882 (2005).
186. Mikesch, L.M. et al. The utility of ETD mass spectrometry in proteomic analysis. *Biochim. Biophys. Acta* **1764**, 1811-1822 (2006).
187. Wiesner, J., Premsler, T. & Sickmann, A. Application of electron transfer dissociation (ETD) for the analysis of posttranslational modifications. *Proteomics* **8**, 4466-4483 (2008).
188. Kim, M.S. & Pandey, A. Electron transfer dissociation mass spectrometry in proteomics. *Proteomics* **12**, 530-542 (2012).
189. Sarbu, M., Ghiulai, R.M. & Zamfir, A.D. Recent developments and applications of electron transfer dissociation mass spectrometry in proteomics. *Amino Acids* **46**, 1625-1634 (2014).
190. Good, D.M., Wirtala, M., McAlister, G.C. & Coon, J.J. Performance characteristics of electron transfer dissociation mass spectrometry. *Mol. Cell. Proteomics* **6**, 1942-1951 (2007).

191. Udeshi, N.D., Compton, P.D., Shabanowitz, J., Hunt, D.F. & Rose, K.L. Methods for analyzing peptides and proteins on a chromatographic timescale by electron-transfer dissociation mass spectrometry. *Nat. Prot.* **3**, 1709-1717 (2008).
192. Liu, J. & McLuckey, S.A. Electron Transfer Dissociation: Effects of Cation Charge State on Product Partitioning in Ion/Ion Electron Transfer to Multiply Protonated Polypeptides. *Int. J. Mass Spectrom.* **330-332**, 174-181 (2012).
193. Pitteri, S.J., Chrisman, P.A. & McLuckey, S.A. Electron-transfer ion/ion reactions of doubly protonated peptides: Effect of elevated bath gas temperature. *Anal. Chem.* **77**, 5662-5669 (2005).
194. Pitteri, S.J., Chrisman, P.A., Hogan, J.M. & McLuckey, S.A. Electron Transfer Ion/Ion Reactions in a Three-Dimensional Quadrupole Ion Trap: Reactions of Doubly and Triply Protonated Peptides with SO₂[•]. *Anal. Chem.* **77**, 1831-1839 (2005).
195. Ko, B.J. & Brodbelt, J.S. Enhanced electron transfer dissociation of peptides modified at C-terminus with fixed charges. *J. Amer. Soc. Mass Spectrom.* **23**, 1991-2000 (2012).
196. Frey, B.L. et al. Chemical derivatization of peptide carboxyl groups for highly efficient electron transfer dissociation. *J. Amer. Soc. Mass Spectrom.* **24**, 1710-1721 (2013).
197. Asakawa, D. & Osaka, I. High-Confidence Sequencing of Phosphopeptides by Electron Transfer Dissociation Mass Spectrometry Using Dinuclear Zinc(II) Complex. *Anal. Chem.* **88**, 12393-12402 (2016).
198. Swaney, D.L., McAlister, G.C. & Coon, J.J. Decision tree-driven tandem mass spectrometry for shotgun proteomics. *Nat. Meth.* **5**, 959-964 (2008).
199. Frese, C.K. et al. Improved peptide identification by targeted fragmentation using CID, HCD and ETD on an LTQ-Orbitrap Velos. *J Proteome Res* **10**, 2377-2388 (2011).
200. Zubarev, R.A., Zubarev, A.R. & Savitski, M.M. Electron capture/transfer versus collisionally activated/induced dissociations: solo or duet? *J. Amer. Soc. Mass Spectrom.* **19**, 753-761 (2008).
201. Riley, N.M. & Coon, J.J. The Role of Electron Transfer Dissociation in Modern Proteomics. *Anal. Chem.* (2017).
202. Han, H., Xia, Y. & McLuckey, S.A. Beam-type collisional activation of polypeptide cations that survive ion/ion electron transfer. *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* **21**, 1567-1573 (2007).

203. Wu, S.L., Huhmer, A.F., Hao, Z. & Karger, B.L. On-line LC-MS approach combining collision-induced dissociation (CID), electron-transfer dissociation (ETD), and CID of an isolated charge-reduced species for the trace-level characterization of proteins with post-translational modifications. *J. Proteome Res.* **6**, 4230-4244 (2007).
204. Xia, Y., Han, H. & McLuckey, S.A. Activation of intact electron-transfer products of polypeptides and proteins in cation transmission mode ion/ion reactions. *Anal. Chem.* **80**, 1111-1117 (2008).
205. Wongkongkathep, P. et al. Enhancing Protein Disulfide Bond Cleavage by UV Excitation and Electron Capture Dissociation for Top-Down Mass Spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom.* **390**, 137-145 (2015).
206. Campbell, J.L., Hager, J.W. & Le Blanc, J.C. On performing simultaneous electron transfer dissociation and collision-induced dissociation on multiply protonated peptides in a linear ion trap. *J. Amer. Soc. Mass Spectrom.* **20**, 1672-1683 (2009).
207. Rathore, D., Aboufazeli, F. & Dodds, E.D. Obtaining complementary polypeptide sequence information from a single precursor ion packet via sequential ion mobility-resolved electron transfer and vibrational activation. *Analyst* **140**, 7175-7183 (2015).
208. Swaney, D.L. et al. Supplemental activation method for high-efficiency electron-transfer dissociation of doubly protonated peptide precursors. *Anal. Chem.* **79**, 477-485 (2007).
209. Frese, C.K. et al. Toward Full Peptide Sequence Coverage by Dual Fragmentation Combining Electron-Transfer and Higher-Energy Collision Dissociation Tandem Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **84**, 9668-9673 (2012).
210. O'Connor, P.B. et al. Long-lived electron capture dissociation product ions experience radical migration via hydrogen abstraction. *J. Amer. Soc. Mass Spectrom.* **17**, 576-585 (2006).
211. Tsybin, Y.O., He, H., Emmett, M.R., Hendrickson, C.L. & Marshall, A.G. Ion activation in electron capture dissociation to distinguish between N-terminal and C-terminal product ions. *Anal. Chem.* **79**, 7596-7602 (2007).
212. Savitski, M.M., Kjeldsen, F., Nielsen, M.L. & Zubarev, R.A. Hydrogen rearrangement to and from radical z fragments in electron capture dissociation of peptides. *J. Amer. Soc. Mass Spectrom.* **18**, 113-120 (2007).
213. Senko, M.W. et al. Novel parallelized quadrupole/linear ion trap/Orbitrap tribrid mass spectrometer improving proteome coverage and peptide identification rates. *Anal. Chem.* **85**, 11710-11714 (2013).

214. Rose, C.M. et al. A calibration routine for efficient ETD in large-scale proteomics. *J. Amer. Soc. Mass Spectrom.* **26**, 1848-1857 (2015).
215. <http://planetorbitrap.com/orbitrap-fusion#tab:schematic>, abgerufen 31.08.2018
216. Ledvina, A.R. et al. Activated-ion electron transfer dissociation improves the ability of electron transfer dissociation to identify peptides in a complex mixture. *Anal. Chem.* **82**, 10068-10074 (2010).
217. Riley, N.M. et al. Phosphoproteomics with Activated Ion Electron Transfer Dissociation. *Anal. Chem.* (2017).
218. Ledvina, A.R. et al. Infrared photoactivation reduces peptide folding and hydrogen-atom migration following ETD tandem mass spectrometry. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **48**, 8526-8528 (2009).
219. Doll, S. & Burlingame, A.L. Mass spectrometry-based detection and assignment of protein posttranslational modifications. *ACS Chem. Biol.* **10**, 63-71 (2015).
220. Olsen, J.V. & Mann, M. Status of large-scale analysis of post-translational modifications by mass spectrometry. *Mol. Cell. Proteomics* **12**, 3444-3452 (2013).
221. Sweet, S.M.M., Bailey, C.M., Cunningham, D.L., Heath, J.K. & Cooper, H.J. Large Scale Localization of Protein Phosphorylation by Use of Electron Capture Dissociation Mass Spectrometry. *Mol. Cell. Proteomics* **8**, 904-912 (2009).
222. Thaysen-Andersen, M., Packer, N.H. & Schulz, B.L. Maturing Glycoproteomics Technologies Provide Unique Structural Insights into the N-glycoproteome and Its Regulation in Health and Disease. *Mol. Cell. Proteomics* **15**, 1773-1790 (2016).
223. Leymarie, N. & Zaia, J. Effective use of mass spectrometry for glycan and glycopeptide structural analysis. *Anal. Chem.* **84**, 3040-3048 (2012).
224. Crowe, S.O., Rana, A., Deol, K.K., Ge, Y. & Strieter, E.R. Ubiquitin Chain Enrichment Middle-Down Mass Spectrometry Enables Characterization of Branched Ubiquitin Chains in Cellulo. *Anal. Chem.* **89**, 4428-4434 (2017).
225. Rana, A., Ge, Y. & Strieter, E.R. Ubiquitin Chain Enrichment Middle-Down Mass Spectrometry (UbiChEM-MS) Reveals Cell-Cycle Dependent Formation of Lys11/Lys48 Branched Ubiquitin Chains. *J. Proteome Res.* **16**, 3363-3369 (2017).

226. Rosenthal, F., Nanni, P., Barkow-Oesterreicher, S. & Hottiger, M.O. Optimization of LTQ-Orbitrap Mass Spectrometer Parameters for the Identification of ADP-Ribosylation Sites. *J. Proteome Res.* **14**, 4072-4079 (2015).
227. Bilan, V., Leutert, M., Nanni, P., Panse, C. & Hottiger, M.O. Combining Higher-Energy Collision Dissociation and Electron-Transfer/Higher-Energy Collision Dissociation Fragmentation in a Product-Dependent Manner Confidently Assigns Proteomewide ADP-Ribose Acceptor Sites. *Anal. Chem.* **89**, 1523-1530 (2017).
228. Erce, M.A., Abeygunawardena, D., Low, J.K., Hart-Smith, G. & Wilkins, M.R. Interactions affected by arginine methylation in the yeast protein-protein interaction network. *Mol. Cell. Proteomics* **12**, 3184-3198 (2013).
229. Low, J.K. et al. Protein substrates of the arginine methyltransferase Hmt1 identified by proteome arrays. *Proteomics* **16**, 465-476 (2016).
230. de Graaf, E.L., Giansanti, P., Altelaar, A.F. & Heck, A.J. Single-step enrichment by Ti⁴⁺-IMAC and label-free quantitation enables in-depth monitoring of phosphorylation dynamics with high reproducibility and temporal resolution. *Mol. Cell. Proteomics* **13**, 2426-2434 (2014).
231. Rayapuram, N. et al. Identification of novel PAMP-triggered phosphorylation and dephosphorylation events in *Arabidopsis thaliana* by quantitative phosphoproteomic analysis. *J. Proteome Res.* **13**, 2137-2151 (2014).
232. Giansanti, P. et al. An Augmented Multiple-Protease-Based Human Phosphopeptide Atlas. *Cell Rep.* **11**, 1834-1843 (2015).
233. Sweet, S.M.M., Creese, A.J. & Cooper, H.J. Strategy for the identification of sites of phosphorylation in proteins: Neutral loss triggered electron capture dissociation. *Anal. Chem.* **78**, 7563-7569 (2006).
234. Bailey, D.J. et al. Instant spectral assignment for advanced decision tree-driven mass spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 8411-8416 (2012).
235. Collins, M.O., Wright, J.C., Jones, M., Rayner, J.C. & Choudhary, J.S. Confident and sensitive phosphoproteomics using combinations of collision induced dissociation and electron transfer dissociation. *J Proteomics* **103**, 1-14 (2014).
236. Wiese, H. et al. Comparison of alternative MS/MS and bioinformatics approaches for confident phosphorylation site localization. *J. Proteome Res.* **13**, 1128-1137 (2014).

237. Marx, H. et al. A large synthetic peptide and phosphopeptide reference library for mass spectrometry-based proteomics. *Nat. Biotechnol.* **31**, 557-+ (2013).
238. Frese, C.K. et al. Unambiguous Phosphosite Localization using Electron-Transfer/Higher-Energy Collision Dissociation (ET_hCD). *J. Proteome Res.* **12**, 1520-1525 (2013).
239. Brunner, A.M. et al. Benchmarking Multiple Fragmentation Methods on an Orbitrap Fusion for Top-down Phospho-Proteoform Characterization. *Anal. Chem.* **87**, 4152-4158 (2015).
240. Tamara, S., Scheltema, R.A., Heck, A.J.R. & Leney, A.C. Phosphate Transfer in Activated Protein Complexes Reveals Interaction Sites. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **56**, 13641-13644 (2017).
241. Schmidt, A., Ammerer, G. & Mechtler, K. Studying the fragmentation behavior of peptides with arginine phosphorylation and its influence on phospho-site localization. *Proteomics* **13**, 945-954 (2013).
242. Schmidt, A. et al. Quantitative Phosphoproteomics Reveals the Role of Protein Arginine Phosphorylation in the Bacterial Stress Response. *Mol. Cell. Proteomics* **13**, 537-550 (2014).
243. Kowalewska, K. et al. Electron capture dissociation mass spectrometric analysis of lysine-phosphorylated peptides. *Biosci. Rep.* **30**, 433-443 (2010).
244. Meins, M. et al. CYSTEINE PHOSPHORYLATION OF THE GLUCOSE TRANSPORTER OF ESCHERICHIA-COLI. *J. Biol. Chem.* **268**, 11604-11609 (1993).
245. Bohrer, B.C., Merenbloom, S.I., Koeniger, S.L., Hilderbrand, A.E. & Clemmer, D.E. Biomolecule analysis by ion mobility spectrometry. *Annu. Rev. Anal. Chem.* **1**, 293-327 (2008).
246. Hofmann, J., Hahm, H.S., Seeberger, P.H. & Pagel, K. Identification of carbohydrate anomers using ion mobility-mass spectrometry. *Nature* **526**, 241-+ (2015).
247. Wu, C., Siems, W.F., Klasmeier, J. & Hill, H.H. Separation of Isomeric Peptides Using Electrospray Ionization/High-Resolution Ion Mobility Spectrometry. *Anal. Chem.* **72**, 391-395 (2000).
248. Ibrahim, Y.M., Shvartsburg, A.A., Smith, R.D. & Belov, M.E. Ultrasensitive identification of localization variants of modified peptides using ion mobility spectrometry. *Anal. Chem.* **83**, 5617-5623 (2011).
249. Xuan, Y., Creese, A.J., Horner, J.A. & Cooper, H.J. High-field asymmetric waveform ion mobility spectrometry (FAIMS) coupled with high-resolution electron transfer dissociation

- mass spectrometry for the analysis of isobaric phosphopeptides. *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* **23**, 1963-1969 (2009).
250. Shvartsburg, A.A., Creese, A.J., Smith, R.D. & Cooper, H.J. Separation of peptide isomers with variant modified sites by high-resolution differential ion mobility spectrometry. *Anal. Chem.* **82**, 8327-8334 (2010).
251. Ruotolo, B.T. et al. Distinguishing between Phosphorylated and Nonphosphorylated Peptides with Ion Mobility–Mass Spectrometry. *J. Proteome Res.* **1**, 303-306 (2002).
252. Ruotolo, B.T. et al. Analysis of Phosphorylated Peptides by Ion Mobility-Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **76**, 6727-6733 (2004).
253. Thalassinou, K. et al. Characterization of Phosphorylated Peptides Using Traveling Wave-Based and Drift Cell Ion Mobility Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **81**, 248-254 (2009).
254. Glover, M.S. et al. Examining the Influence of Phosphorylation on Peptide Ion Structure by Ion Mobility Spectrometry-Mass Spectrometry. *J. Amer. Soc. Mass Spectrom.* **27**, 786-794 (2016).
255. Turecek, F. et al. Gas-phase structures of phosphopeptide ions: A difficult case. *Int. J. Mass Spectrom.* **354-355**, 249-256 (2013).
256. Kim, D. et al. Probing the electron capture dissociation mass spectrometry of phosphopeptides with traveling wave ion mobility spectrometry and molecular dynamics simulations. *J. Amer. Soc. Mass Spectrom.* **26**, 1004-1013 (2015).
257. Ong, S.E. et al. Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol. Cell. Proteomics* **1**, 376-386 (2002).
258. Boersema, P.J., Raijmakers, R., Lemeer, S., Mohammed, S. & Heck, A.J. Multiplex peptide stable isotope dimethyl labeling for quantitative proteomics. *Nat. Prot.* **4**, 484-494 (2009).
259. Anderson, L. & Hunter, C.L. Quantitative mass spectrometric multiple reaction monitoring assays for major plasma proteins. *Mol. Cell. Proteomics* **5**, 573-588 (2006).
260. Zanivan, S. et al. In vivo SILAC-based proteomics reveals phosphoproteome changes during mouse skin carcinogenesis. *Cell Rep.* **3**, 552-566 (2013).
261. Monetti, M., Nagaraj, N., Sharma, K. & Mann, M. Large-scale phosphosite quantification in tissues by a spike-in SILAC method. *Nat. Meth.* **8**, 655-U674 (2011).
262. Wiese, S., Reidegeld, K.A., Meyer, H.E. & Warscheid, B. Protein labeling by iTRAQ: a new tool for quantitative mass spectrometry in proteome research. *Proteomics* **7**, 340-350 (2007).

263. Werner, T. et al. High-resolution enabled TMT 8-plexing. *Anal. Chem.* **84**, 7188-7194 (2012).
264. Wenger, C.D. et al. Gas-phase purification enables accurate, multiplexed proteome quantification with isobaric tagging. *Nat. Meth.* **8**, 933-935 (2011).
265. McAlister, G.C. et al. MultiNotch MS3 enables accurate, sensitive, and multiplexed detection of differential expression across cancer cell line proteomes. *Anal. Chem.* **86**, 7150-7158 (2014).
266. Riley, N.M. & Coon, J.J. Phosphoproteomics in the Age of Rapid and Deep Proteome Profiling. *Anal. Chem.* **88**, 74-94 (2016).
267. Neilson, K.A. et al. Less label, more free: approaches in label-free quantitative mass spectrometry. *Proteomics* **11**, 535-553 (2011).
268. Ahrends, R., Pieper, S., Neumann, B., Scheler, C. & Linscheid, M.W. Metal-coded affinity tag labeling: a demonstration of analytical robustness and suitability for biological applications. *Anal. Chem.* **81**, 2176-2184 (2009).
269. Ahrends, R. et al. A metal-coded affinity tag approach to quantitative proteomics. *Mol. Cell. Proteomics* **6**, 1907-1916 (2007).
270. Beausoleil, S.A., Villen, J., Gerber, S.A., Rush, J. & Gygi, S.P. A probability-based approach for high-throughput protein phosphorylation analysis and site localization. *Nat. Biotechnol.* **24**, 1285-1292 (2006).
271. Oslund, R.C. et al. A Phosphohistidine Proteomics Strategy Based on Elucidation of a Unique Gas-Phase Phosphopeptide Fragmentation Mechanism. *J. Amer. Chem. Soc.* **136**, 12899-12911 (2014).
272. Deutscher, J. et al. The bacterial phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase system: regulation by protein phosphorylation and phosphorylation-dependent protein-protein interactions. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **78**, 231-256 (2014).
273. Pas, H.H. & Robillard, G.T. S-phosphocysteine and phosphohistidine are intermediates in the phosphoenolpyruvate-dependent mannitol transport catalyzed by *Escherichia coli* EIIMtl. *Biochem.* **27**, 5835-5839 (1988).
274. Pas, H.H. et al. ³¹P-NMR demonstration of phosphocysteine as a catalytic intermediate on the *Escherichia coli* phosphotransferase system EIIMtl. *J. Biol. Chem.* **266**, 6690-6692 (1991).

275. Marmelstein, A. et al. Pyrophosphorylation via selective phosphoprotein derivatization. *Chem. Sci.* (2018).
276. Rogerson, D.T. et al. Efficient genetic encoding of phosphoserine and its nonhydrolyzable analog. *Nat. Chem. Biol.* **11**, 496-503 (2015).
277. Hoang, T.T. & Raines, R.T. Molecular basis for the autonomous promotion of cell proliferation by angiogenin. *Nucleic Acids Res.* **45**, 818-831 (2017).
278. Yang, Y.S. et al. Tyrosine sulfation as a protein post-translational modification. *Molecules* **20**, 2138-2164 (2015).
279. Sievers, E.L. & Senter, P.D. Antibody-drug conjugates in cancer therapy. *Annu Rev Med* **64**, 15-29 (2013).
280. Senter, P.D. & Sievers, E.L. The discovery and development of brentuximab vedotin for use in relapsed Hodgkin lymphoma and systemic anaplastic large cell lymphoma. *Nat. Biotechnol.* **30**, 631-637 (2012).
281. Ducry, L. & Stump, B. Antibody-drug conjugates: linking cytotoxic payloads to monoclonal antibodies. *Bioconjug Chem* **21**, 5-13 (2010).
282. Beck, A., Goetsch, L., Dumontet, C. & Corvaia, N. Strategies and challenges for the next generation of antibody-drug conjugates. *Nat Rev Drug Discov* **16**, 315-337 (2017).
283. Fellers, R.T. et al. ProSight Lite: graphical software to analyze top-down mass spectrometry data. *Proteomics* **15**, 1235-1238 (2015).
284. Hergeth, S.P. & Schneider, R. The H1 linker histones: multifunctional proteins beyond the nucleosomal core particle. *Embo Rep.* **16**, 1439-1453 (2015).
285. Moradian, A., Kalli, A., Sweredoski, M.J. & Hess, S. The top-down, middle-down, and bottom-up mass spectrometry approaches for characterization of histone variants and their post-translational modifications. *Proteomics* **14**, 489-497 (2014).
286. Sidoli, S., Lin, S., Karch, K.R. & Garcia, B.A. Bottom-Up and Middle-Down Proteomics Have Comparable Accuracies in Defining Histone Post-Translational Modification Relative Abundance and Stoichiometry. *Anal. Chem.* **87**, 3129-3133 (2015).
287. Sidoli, S. et al. Drawbacks in the use of unconventional hydrophobic anhydrides for histone derivatization in bottom-up proteomics PTM analysis. *Proteomics* **15**, 1459-1469 (2015).

288. Meert, P., Govaert, E., Scheerlinck, E., Dhaenens, M. & Deforce, D. Pitfalls in histone propionylation during bottom-up mass spectrometry analysis. *Proteomics* **15**, 2966-2971 (2015).
289. Garcia, B.A. et al. Chemical derivatization of histones for facilitated analysis by mass spectrometry. *Nat. Prot.* **2**, 933-938 (2007).
290. Yue, H., Fang, H., Wei, S., Hayes, J.J. & Lee, T.H. Single-Molecule Studies of the Linker Histone H1 Binding to DNA and the Nucleosome. *Biochem.* **55**, 2069-2077 (2016).
291. Chen, C.C., Smith, D.L., Bruegger, B.B., Halpern, R.M. & Smith, R.A. OCCURRENCE AND DISTRIBUTION OF ACID-LABILE HISTONE PHOSPHATES IN REGENERATING RAT-LIVER. *Biochem.* **13**, 3785-3789 (1974).
292. Takagi, M., Absalon, M.J., McLure, K.G. & Kastan, M.B. Regulation of p53 translation and induction after DNA damage by ribosomal protein L26 and nucleolin. *Cell* **123**, 49-63 (2005).
293. Castello, A. et al. Insights into RNA biology from an atlas of mammalian mRNA-binding proteins. *Cell* **149**, 1393-1406 (2012).
294. Nagata, T. et al. Structure and interactions with RNA of the N-terminal UUAG-specific RNA-binding domain of hnRNP D0. *J. Mol. Biol.* **287**, 221-237 (1999).
295. Grosset, C. et al. A mechanism for translationally coupled mRNA turnover: interaction between the poly(A) tail and a c-fos RNA coding determinant via a protein complex. *Cell* **103**, 29-40 (2000).
296. Lee, K.H. et al. AUF1 contributes to Cryptochrome1 mRNA degradation and rhythmic translation. *Nucleic Acids Res.* **42**, 3590-3606 (2014).
297. Ramasubbu, N., Ragunath, C. & Mishra, P.J. Probing the role of a mobile loop in substrate binding and enzyme activity of human salivary amylase. *J. Mol. Biol.* **325**, 1061-1076 (2003).
298. Ma, T., Peng, Y., Huang, W., Liu, Y. & Ding, J. The beta and gamma subunits play distinct functional roles in the alpha2betagamma heterotetramer of human NAD-dependent isocitrate dehydrogenase. *Sci. Rep.* **7**, 41882 (2017).
299. Sagona, A.P. et al. PtdIns(3)P controls cytokinesis through KIF13A-mediated recruitment of FYVE-CENT to the midbody. *Nat. Cell Biol.* **12**, 362-371 (2010).
300. Bonne, G. et al. Mutations in the gene encoding lamin A/C cause autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nat. Genet.* **21**, 285-288 (1999).

- 301. De Sandre-Giovannoli, A. et al. Homozygous defects in LMNA, encoding lamin A/C nuclear-envelope proteins, cause autosomal recessive axonal neuropathy in human (Charcot-Marie-Tooth disorder type 2) and mouse. *Am. J. Hum. Genet.* **70**, 726-736 (2002).
- 302. Albuquerque, C.P. et al. A multidimensional chromatography technology for in-depth phosphoproteome analysis. *Mol. Cell. Proteomics* **7**, 1389-1396 (2008).
- 303. Tholey, A., Reed, J. & Lehmann, W.D. Electrospray tandem mass spectrometric studies of phosphopeptides and phosphopeptide analogues. *J. Mass Spectrom.* **34**, 117-123 (1999).
- 304. Boersema, P.J., Mohammed, S. & Heck, A.J.R. Phosphopeptide fragmentation and analysis by mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **44**, 861-878 (2009).
- 305. Attard, T.J., O'Brien-Simpson, N. & Reynolds, E.C. Synthesis of phosphopeptides in the fmoc mode. *Intern. J. Pept. Res. Therap.* **13**, 447-468 (2007).
- 306. Palumbo, A.M., Tepe, J.J. & Reid, G.E. Mechanistic insights into the multistage gas-phase fragmentation behavior of phosphoserine- and phosphothreonine-containing peptides. *J. Proteome Res.* **7**, 771-779 (2008).
- 307. Hoffman, M.D., Sniatynski, M.J., Rogalski, J.C., Le Blanc, J.C.Y. & Kast, J. Multiple neutral loss monitoring (MNM): A multiplexed method for post-translational modification screening. *J. Amer. Soc. Mass Spectrom.* **17**, 307-317 (2006).
- 308. DeGnore, J.P. & Qin, J. Fragmentation of phosphopeptides in an ion trap mass spectrometer. *J. Amer. Soc. Mass Spectrom.* **9**, 1175-1188 (1998).
- 309. Penkert, M. et al. Unambiguous Identification of Serine and Threonine Pyrophosphorylation Using Neutral-Loss-Triggered Electron-Transfer/Higher-Energy Collision Dissociation. *Anal. Chem.* **89**, 3672-3680 (2017).
- 310. Kharchenko, A., Vladimirov, G., Heeren, R.M. & Nikolaev, E.N. Performance of Orbitrap mass analyzer at various space charge and non-ideal field conditions: simulation approach. *J. Amer. Soc. Mass Spectrom.* **23**, 977-987 (2012).
- 311. Mayya, V. et al. Quantitative phosphoproteomic analysis of T cell receptor signaling reveals system-wide modulation of protein-protein interactions. *Sci. Signal.* **2**, ra46 (2009).
- 312. Hebert, A.S. et al. Improved Precursor Characterization for Data-Dependent Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **90**, 2333-2340 (2018).

313. Moeslein, F.M., Myers, M.P. & Landreth, G.E. The CLK family kinases, CLK1 and CLK2, phosphorylate and activate the tyrosine phosphatase, PTP-1B. *J. Biol. Chem.* **274**, 26697-26704 (1999).
314. Eisenreich, A. et al. Cdc2-like kinases and DNA topoisomerase I regulate alternative splicing of tissue factor in human endothelial cells. *Circ. Res.* **104**, 589-599 (2009).
315. Chowdhury, D. et al. The exonuclease TREX1 is in the SET complex and acts in concert with NM23-H1 to degrade DNA during granzyme A-mediated cell death. *Mol. Cell.* **23**, 133-142 (2006).
316. Fan, Z., Beresford, P.J., Oh, D.Y., Zhang, D. & Lieberman, J. Tumor suppressor NM23-H1 is a granzyme A-activated DNase during CTL-mediated apoptosis, and the nucleosome assembly protein SET is its inhibitor. *Cell* **112**, 659-672 (2003).
317. Liu, H. et al. Cloning and functional analysis of FLJ20420: a novel transcription factor for the BAG-1 promoter. *PLoS One* **7**, e34832 (2012).
318. Ott, C., Dorsch, E., Fraunholz, M., Straub, S. & Kozjak-Pavlovic, V. Detailed analysis of the human mitochondrial contact site complex indicate a hierarchy of subunits. *PLoS One* **10**, e0120213 (2015).
319. Betapudi, V. Myosin II motor proteins with different functions determine the fate of lamellipodia extension during cell spreading. *PLoS One* **5**, e8560 (2010).
320. Calo, E. et al. RNA helicase DDX21 coordinates transcription and ribosomal RNA processing. *Nature* **518**, 249-253 (2015).
321. Flores, I.L. et al. EEF1D modulates proliferation and epithelial-mesenchymal transition in oral squamous cell carcinoma. *Clin. Sci.* **130**, 785-799 (2016).
322. Yamaguchi, Y. et al. NELF, a multisubunit complex containing RD, cooperates with DSIF to repress RNA polymerase II elongation. *Cell* **97**, 41-51 (1999).
323. Yamaguchi, Y., Inukai, N., Narita, T., Wada, T. & Handa, H. Evidence that negative elongation factor represses transcription elongation through binding to a DRB sensitivity-inducing factor/RNA polymerase II complex and RNA. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 2918-2927 (2002).
324. Woodford, M.R. et al. Tumor suppressor Tsc1 is a new Hsp90 co-chaperone that facilitates folding of kinase and non-kinase clients. *Embo J.* **36**, 3650-3665 (2017).

325. Forsythe, H.L., Jarvis, J.L., Turner, J.W., Elmore, L.W. & Holt, S.E. Stable association of hsp90 and p23, but Not hsp70, with active human telomerase. *J. Biol. Chem.* **276**, 15571-15574 (2001).
326. Woodford, M.R. et al. The FNIP co-chaperones decelerate the Hsp90 chaperone cycle and enhance drug binding. *Nat. Commun.* **7**, 12037 (2016).
327. Maggi, L.B., Jr. et al. Nucleophosmin serves as a rate-limiting nuclear export chaperone for the Mammalian ribosome. *Mol. Cell. Biol.* **28**, 7050-7065 (2008).
328. Krause, A. & Hoffmann, I. Polo-like kinase 2-dependent phosphorylation of NPM/B23 on serine 4 triggers centriole duplication. *PLoS One* **5**, e9849 (2010).
329. Ma, Z. et al. Interaction between ROCK II and nucleophosmin/B23 in the regulation of centrosome duplication. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 9016-9034 (2006).
330. Liu, X. et al. Nucleophosmin (NPM1/B23) interacts with activating transcription factor 5 (ATF5) protein and promotes proteasome- and caspase-dependent ATF5 degradation in hepatocellular carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* **287**, 19599-19609 (2012).
331. Swaminathan, V., Kishore, A.H., Febitha, K.K. & Kundu, T.K. Human histone chaperone nucleophosmin enhances acetylation-dependent chromatin transcription. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 7534-7545 (2005).
332. Fort, K.L. et al. Exploring ECD on a Benchtop Q Exactive Orbitrap Mass Spectrometer. *J Proteome Res* **17**, 926-933 (2018).
333. Lang, D. et al. Probing the acetylation code of histone H4. *Proteomics* **13**, 2989-2997 (2013).
334. Olsen, J.V. et al. Quantitative phosphoproteomics reveals widespread full phosphorylation site occupancy during mitosis. *Sci. Signal.* **3**, ra3 (2010).
335. Rigbolt, K.T. et al. System-wide temporal characterization of the proteome and phosphoproteome of human embryonic stem cell differentiation. *Sci. Signal.* **4**, rs3 (2011).
336. Dephoure, N. et al. A quantitative atlas of mitotic phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 10762-10767 (2008).

7 Anhang

Abkürzungsverzeichnis

2-D	zweidimensional
Abb	Abbildung
ABL	<i>Abelson murine leukemia</i>
ACN	Acetonitril
ADAP	<i>adhesion and degranulation promoting adapter protein</i> , adhäsions- und degranulationsunterstützendes Adapterprotein
AGC	<i>automatic gain control</i>
AI-ETD	<i>activated ion electron-transfer dissociation</i> , Aktiviertes Ionen ETD
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AmBic	Ammoniumbicarbonat
AML	Akute myeloische Leukämie
Å	Angström
BCR	<i>breakpoint cluster region</i>
C ₄	Chromatographiematerial auf Basis von Kieselgel und Tetrahylsilanen
C ₁₈	Chromatographiematerial auf Basis von Kieselgel und Octadecylsilanen
CAM, cam	Carboxyamidomethyl
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CCS	<i>collision cross-section</i> , Kollisionsquerschnitt
CDP	<i>cysteine-dependent protein phosphatase</i> , Cystein abhängige Proteinphosphatasen
CID	<i>collision-induced dissociation</i> , Kollisionsinduzierte Dissoziation
CML	Chronische myeloische Leukämie
Da	Dalton
DAR	<i>drug to antibody ratio</i> , Wirkstoff-Antikörper-Verhältnis
DCM	Dichlormethan
DDA	<i>data dependent acquisition</i> , datenabhängige Aufzeichnung
DDNL-ETHcD	<i>data dependent neutral loss trigger ETHcD</i> , datenabhängiger neutralverlustgetriggert ETHcD-Ansatz
DGMS	Deutsche Gesellschaft für Massenspektrometrie
DIA	<i>data independent acquisition</i> , datenunabhängige Aufzeichnung
DIPEA	N,N-Diisopropylethylamin

DMA	N,N-Dimethylacetamid
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> , standardisiertes Nährmedium für die Zellkultur
DMF	N,N-Dimethylformamid
DPA-Ligand	Di-(2-pyridyl)amid-Ligand
DTT	Dithiothreitol
EASY-IC	Easy internal calibration, Einfache interne Kalibrierung
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ESI	<i>electrospray ionisation</i> , Elektrospray-Ionisation
<i>et al.</i>	und andere
ECD	<i>electron-capture dissociation</i> Elektroneneinfang Dissoziation
ERLIC	<i>electrostatic repulsion-hydrophilic interaction chromatography</i>
ETciD	<i>electron-transfer collision induced dissociation</i> , Elektronentransfer kollisionsinduzierte Dissoziation
EThcD	<i>electron-transfer/higher energy collision dissociation</i> , Elektronentransfer/hochenergetische kollisionsinduzierte Dissoziation
ETD	<i>electron-transfer dissociation</i> , Elektronentransfer Dissoziation
FA	<i>formic acid</i> , Ameisensäure
FBS	<i>fetal bovine serum</i> , fetales Kälberserum
FDR	<i>false discovery rate</i> , falsch positiv Rate
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
FTICR	Fouriertransformation-Ionenzyklotronresonanz-Massenspektrometrie
FTMS	Fouriertransformmassenspektrometrie
FWHM	<i>full width at half maximum</i> , Halbwertsbreite
GDCh	Gesellschaft Deutscher Chemiker
HBTU	2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophospha
HCD	<i>higher-energy collision dissociation</i> , hochenergetische kollisionsinduzierte Dissoziation
HEK-Zellen	<i>human embryonic kidney-Zellen</i> , menschliche embryonale Nierenzellen
HeLa	menschliche Epithelzellen eines Zervixkarzinoms der afroamerikanischen Patientin Henrietta Lacks entnommen
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> , Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRMS	<i>high resolution mass spectrometry</i> , hochaufgelöste Massenspektrometrie
ICP-MS	<i>Inductively coupled plasma-mass spectrometry</i> , Induktiv gekoppeltes Plasma MS
IDA	<i>iminodiacetic acid</i> , Iminodiessigsäure
IP7	Inositolpyrophosphat-7
IEX	<i>ion exchange chromatography</i> , Ionenaustauschchromatographie

IMAC	<i>immobilized metal affinity chromatography</i> , immobilisierten Metallaffinitätschromatographie
IM-MS	Ionenmobilitätsmassenspektrometrie
IT	<i>iontrap</i> , Ionenfalle
iTRAQ	<i>isobaric Tags for Relative and Absolute Quantification</i> , isobare Markierung für relative und absolute Quantifizierung
LC	<i>liquid chromatography</i> , Flüssigkeitschromatographie
LK	Leichte Kette des Antikörpers
LMCO	<i>low mass cutoff</i>
m	Masse
mAbs	<i>monoclonal antibodies</i> , monoklonale Antikörper
MeCAT	<i>metal-coded affinity tag</i> , Metallkodierte Affinitätslabel
MeOH	Methanol
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
min	Minute
MOAC	<i>metal oxide affinity chromaography</i> , Metalloxidaffinitätschromatographie
MRM	<i>multi reaction monitoring</i>
ms	Millisekunde
MS	Massenspektrometrie
MS/MS, MS ²	Tandemmassenspektrometrie
msa	<i>multistage activation</i> , mehrstufige Aktivierung
mTRAQ	<i>mass differential Tags for Relative and Absolute Quantification</i> , massenabweichende Markierungen für relative und absolute Quantifizierung
<i>m/z</i>	Masse-zu-Ladungsverhältnis
nanoLC	Nanoflüssigkeitschromatographie
NCE	<i>normalized collision energy</i> , normalisierte Kollisionsenergie
NL	<i>neutral loss</i> , Neutralverlust
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> , Kernspinresonanzspektroskopie
NTA	<i>nitrilotriacetic acid</i> , Nitrilotriessigsäure
OT	Orbitrap
ox	Oxidation
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAM, pam	propionamid
pArg	Argininphosphorylierung
PAPS	Phosphoadenosinphosphosulfat
PASEF	<i>parallel accumulation-serial fragmentation</i> , parallele Sammlung und serielle Fragmentierung

pCys	Cysteinphosphorylierung
pHis	Histidinphosphorylierung
pI	Isoelektrischer Punkt
pLys	Lysinphosphorylierung
PMSF	Phenylmethylsulfonylfleurid
ppm	<i>parts per million</i>
ppSer	Serinpyrophosphorylierung
ppThr	Threoninpyrophosphorylierung
pPye	Phosphonopyrazolyethylamin
pPza	4-Phosphopyrazolyl-2-ylalanin
pSer	Serinphosphorylierung
PSM	<i>peptide spectrum match</i>
pThr	Threoninphosphorylierung
PTM	posttranslationale Modifikation
pTyr	Tyrosinphosphorylierung
pTza	Phosphotriazolylalanin
pTze	<i>phosphoryl-triazolyethylamine</i> , Phosphoryl-Triazoethylamin
QQQ	Tripelquadrupolmassenspektrometer
Q-TOF	Quadrupol-Time of flight-Massenspektrometer
R	<i>resolution</i> , Auflösung
RP	<i>reversed phase</i> , Umkehrphase
rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
sa	<i>supplemental activation</i> , zusätzliche Aktivierung
SAX	<i>strong anion exchange chromatography</i> , starke Anionenaustauschchromatographie
SCX	<i>strong cation exchange chromatography</i> , starke Kationenaustauschchromatographie
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SILAC	<i>stable isotope labeling with amino acids in cell culture</i> , stabile Isotopenmarkierung mit Aminosäuren in Zellkultur
SIM	<i>single ion monitoring</i>
SK	Schwere Kette des Antikörpers
SPPS	<i>solid phase peptide synthesis</i> , Festphasenpeptidsynthese
SRM	<i>single reaction monitoring</i> , Einzelionenbeobachtung
Tab.	Tabelle
TEA	Triethylamin

TFA	<i>trifluoroacetic acid</i> , Trifluoressigsäure
TIC	<i>total ion current</i> , Totalionenstrom
TIMS	<i>Trapped Ion Mobility Spectrometry</i>
TMT	<i>tandem mass tags</i> , Atommassenmarkierung
TOF	<i>time of light</i> , Flugzeit
UPLC-UV	<i>ultra performance liquid chromatography</i> mit UV-Detektor
UV-Licht	Ultraviolettes Licht
UVPD	<i>UV-photodissociation</i> , UV-Photodissoziation
wt	<i>wild-type</i> , Wildtyp
XIC	<i>extracted ion chromatogramm</i> , extrahiertes Ionenchromatogramm
<i>z</i>	Ladung

Abkürzungen Aminosäuren:

Einbuchstabencode	Dreibuchstabencode	Aminosäure
A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Asparaginsäure
E	Glu	Glutaminsäure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Iso	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der kinase- und phosphataseabhängigen Proteinphosphorylierung.	1
Abbildung 2: Struktur des ABL-Tyrosinkinaseinhibitors Imantinib (Handelsname: Glivec™) zur Behandlung verschiedener Leukämieformen.	2
Abbildung 3: Struktur der O-Phosphorylierungen von Serin, Threonin und Tyrosin.	3
Abbildung 4: Struktur labiler Phosphorylierungen und deren Nachweis <i>in vitro</i> (blau) oder <i>in vivo</i> (grün). ³⁴	4
Abbildung 5: Angenommene Strukturen und Ladungsverteilungen von pHis, pArg und pLys unter einem physiologischem pH-Wert. ^{20, 34, 58, 59}	6
Abbildung 6: Allgemeines Schema zur Darstellung labiler Peptidphosphorylierungen. ³⁴	8
Abbildung 7: Synthesestrategie zur positionsspezifischen Einführung von pArg. ^{34, 68}	9
Abbildung 8: Chemoselektive Synthesen von pLys-Peptiden. ³⁴	10
Abbildung 9: Chemoselektive Synthese von Cysteinphosphorylierungen. ³⁴	11
Abbildung 10: Chemoselektive Synthese von pyrophosphorylierten Peptiden. ^{34, 74, 75}	12
Abbildung 11: Schema des Ablaufes eines <i>bottom-up</i> -Phosphoproteomikansatzes ^{83, 85-91}	14
Abbildung 12: Gegenüberstellung der Histidinisomere π -pHis und τ -pHis mit ihren säurestabilen Analoga zur Herstellung von pHis-spezifischen Antikörpern. ¹³²⁻¹³⁵	18
Abbildung 13: Gegenüberstellung von Phosphoarginin mit deren säurestabilen Analoga zur Herstellung von pArg-spezifischen Antikörpern. ^{140, 141}	19
Abbildung 14: Syntheseroute für die Herstellung des harzgebundenen, dinuklearen Zink(II)-komplexes, welcher zur Anreicherung pyrophosphorylierter Peptide eingesetzt wird. ¹⁴³	20
Abbildung 15: Schema der Fraktionierung in einem 2D-RPLC-RPLC-MS-Ansatz.....	23
Abbildung 16: Typen von Fragmentionen, deklariert nach der Nomenklatur von.....	25
Abbildung 17: Fragmentionen außerhalb der Nomenklatur von Roepstorff und Fohlman. ¹⁶⁸	25
Abbildung 18: Schematische Darstellung eines Q-Exactive™ Orbitrap Massenspektrometers.	27
Abbildung 19: Beschreibung des Fragmentierungsverhaltens von Peptiden während der CID anhand des mobilen Protonenmodells.....	28
Abbildung 20: Schematische Darstellung der kollisionsbasierten Fragmentierung modifizierter Peptide.....	29
Abbildung 21: Fragmentierungsschema einer Elektrontransferdissoziation.	31
Abbildung 22: Schema des Aufbaus eines Orbitrap Fusion™ Tribridmassenspektrometers. ²¹⁵	33
Abbildung 23: Schematische Darstellung der ETD eines modifizierten Peptides.	34
Abbildung 24: Struktur einer Tandem-Massenmarkierung (tandem mass tags, TMT).....	38
Abbildung 25: Strategien zur Quantifizierung des Phosphoproteoms. ²⁶⁶	39
Abbildung 26: CID Fragmentspektrum des Precursorions des pCys-Peptides EQLpCFSLYNAQR... 43	

Abbildung 27: Einfluss der normalisierten Kollisionsenergie (NCE) auf die Neutralverluste 80, 98 & 116 Da am Beispiel des Peptides IGIHSGSpCVAGVVGLTMPR.....	44
Abbildung 28: HCD-Fragmentspektrum des doppelt protonierten, cysteinphosphorylierten Peptides EQLpCFSLYNAQR.	44
Abbildung 29: EThcD-Fragmentspektrum des dreifach geladenen Precursorions des pCys-Peptides EQLpCFSLYNAQR.	45
Abbildung 30: Workflow der Identifizierung einer endogenen Cysteinphosphorylierung. ⁶¹	47
Abbildung 31: Nachweis einer natürlichen Cysteinphosphorylierung.....	49
Abbildung 32: ETD-MS/MS-Spektrum des doppelt protonierten Peptides pArg 5 (NGFLVpREQDPK).	51
Abbildung 33: Gegenüberstellung der ETD-MS/MS Spektren des Peptides pArg5 mit verschiedenen ETD-Reaktionszeiten.	52
Abbildung 34: HCD-Spektrum des doppelt protonierten Peptides NGFLVpREQDPK.	53
Abbildung 35: ETHCD-Spektrum des doppelt protonierten Peptides NGFLVpREQDPK.	54
Abbildung 36: Durchschnittliche relative Abundanz von Precursorionen, ladungsreduzierten Precursorionen und Neutralverlusten von Precursorionen.	55
Abbildung 37: Gegenüberstellung der relativen Abundanzen von Fragmenten und deren Neutralverlustspezies während HCD und EThcD.	57
Abbildung 38: Relative Abundanzen von b-, c-, y- und z-Fragmenten (%) des Peptides NGFLVpREQDPK (pArg 5) unter verschiedenen EThcD-Bedingungen.	60
Abbildung 39: Durchschnittliche relative Abundanzen (%) der b-, c-, y- und z Fragmenten des Peptides pArg5 bei einer zusätzlich Aktivierung von 30% und unter verschiedenen Reaktionszeiten. ...	62
Abbildung 40: Durchschnittlicher Sequest Xcorr Score der identifizierten Peptide und Identifizierungsraten (ID-Rate) in Abhängigkeit der EThcD-Bedingungen.	63
Abbildung 41: ETHCD-Spektrum und Spaltungsmuster des Peptides pLys5.	64
Abbildung 42: Pyrophosphorylierung von Myo-D127pS.	67
Abbildung 43: HPLC-MS Analyse der intakten pyrophosphorylierten Myoglobinmutante.....	68
Abbildung 44: Charakterisierung der Reaktionsprodukte mittels <i>bottom-up</i> -Ansatz.	69
Abbildung 45: Nachweis der positionsspezifischen Pyrophosphorylierung von Myo-D127ppS. ...	70
Abbildung 46: Positionsspezifische Synthese von Cysteinphosphorylierungen.	71
Abbildung 47: Dekonvoliertes Spektrum eines Syntheseansatzes zur positionsspezifischen Cysteinphosphorylierung einer Angiogeninmutante.	71
Abbildung 48: Charakterisierung der Reaktionsprodukte nach selektiver Cysteinphosphorylierung der Angiogeninmutante Ang-S87C mittels <i>bottom-up</i> -Ansatz.....	72
Abbildung 49: Nachweis der positionsspezifischen Cysteinphosphorylierung von Ang-S87pC.....	73
Abbildung 50: Schematische Darstellung der Struktur des alkinphosphonamidbasierten ADCs.	74
Abbildung 51: Identifizierung von Antikörper-Wirkstoff-Konjugatuntereinheiten mittels HPLC-MS.75	

Abbildung 52: Bestimmung des Antikörper-Wirkstoff-Verhältnisses (DAR).....	76
Abbildung 53: Charakterisierung der modifizierten, leichten Kette Trastuzumabs.	77
Abbildung 54: Lokalisierung des Cysteinphosphonamidates auf der leichten Kette mittels EThcD....	78
Abbildung 55: <i>Top-down</i> -Ansatz zur Charakterisierung von Myoglobin.....	79
Abbildung 56: Vergleich der Leistungsfähigkeit verschiedener ETD-Techniken zur <i>top-down</i> - Fragmentierung von Myoglobin.....	80
Abbildung 57: Sequenzabdeckung des Myoglobins nach <i>top-down</i> -Fragmentierung mittels EThcD..	81
Abbildung 58: Migration von Phosphatresten lysinphosphorylierter Peptide während EThcD.	82
Abbildung 59: Gegenüberstellung der verschiedenen Histon H1 Isotope.....	84
Abbildung 60: Einfluss der Propionylierung auf das RP-chromatographische Verhalten und die Ladungsverteilung des Histon H1 Peptides KKKARKSAGAAKRKASG.....	87
Abbildung 61: Overlay der extrahierten Ionenchromatogramme der siebenfach (rot) sechsfach (blau) und fünffach (grün) propionylierten Spezies des Modellpeptides KKKARKSAGAAKRKASG.	88
Abbildung 62: Chromatographisches und massenspektrometrisches Verhalten des propionylierten pLys-Histonpeptides 2prKprKprKARpKSAGAAprKRprKASG.....	89
Abbildung 63: Sequenzabdeckung einer Histon H1 Variante nach Propionylierung und anschließendem Pseudo-ArgC-Verdau mit Trypsin.....	90
Abbildung 64: Chromatogramm der WCX-Trennung von Myoglobin, Serumalbumin, β -Casein, β - Lactoglobulin & Cytochrom C.....	92
Abbildung 65: Gegenüberstellung von saurer und basischer erster Dimension in einem 2D-RPLC- RPLC-MS/MS-Ansatz zur Charakterisierung eines HeLa-Vollproteoms.....	94
Abbildung 66: Vergleich des Fraktionierungsverhaltens nach saurer und basischer Fraktionierung. ..	95
Abbildung 67: Mit HCD und EThcD erzielte Anzahl an zugeordneten PSMs von Phosphopeptiden eines HeLa-Phosphoproteoms.....	96
Abbildung 68: Neutralverlustmuster von pLys-Peptiden unter HCD-Bedingungen.....	97
Abbildung 69: HCD-Spektrum des Peptides pLys4 (LpKTEAEMK).	98
Abbildung 70: Einfluss des Ladungszustandes auf die Abundanz von pLys-Immoniumionen.....	100
Abbildung 71: Schematische Darstellung des datenabhängigen pLys-Immoniumionen getriggerten EThcD-Ansatzes.....	101
Abbildung 72: Chromatogramm und Gradient der IMAC-Phosphopeptidanreicherung eines HeLa- Proteoms.....	104
Abbildung 73: Vergleich verschiedener Verfahren zur Anreicherung von Phosphopeptiden.	105
Abbildung 74: Peptidüberlappung nach IMAC-Anreicherung und Fraktionierung.....	106
Abbildung 75: (a) Anzahl der PSMs und deren Massenabweichung. (b) Massenabweichung der PSMs in Abhängigkeit der Retentionszeit.	107
Abbildung 76: Nachweis der endogenen Histidinphosphorylierung von Premalin-A/C.	108
Abbildung 77: Beispiel für isobare pyro- und diphosphorylierte Peptide.....	110

Abbildung 78: Chromatographisches Verhalten von di- und pyrophosphorylierten Peptiden.	111
Abbildung 79: HCD MS/MS Fragmentspektrum des Peptides ISIDppSSDEESELKK PP-4.	113
Abbildung 80: CID-MS/MS Spektren isobarer di- und pyrophosphorylierter Peptide.	114
Abbildung 81: Einfluss des Ladungszustandes auf das Neutralverlustmuster von di- und pyrophosphorylierten Peptiden.	116
Abbildung 82: Einfluss der NCE auf die Intensität der Neutralverluste.	117
Abbildung 83: CID-MS/MS-Spektrum des pyrophosphorylierten Peptides KIHDppTSDEDMAINGLER.	119
Abbildung 84: Vergleich des CID Fragmentierungsverhaltens der zwei pyrophosphorylierten Peptide (PP-4) und (PP-8).	120
Abbildung 85: CID-MS/MS-Spektrum des dreifach geladenen Precursorions m/z 701,953 des Peptides KIHDpTpSDEDMAINGLER.	121
Abbildung 86: Ionenmobilitätsspuren der Peptide SKVEDAEYEppSSDDEDEKLDK und SKVEDAEYEppSpSDDEDEKLDK.	122
Abbildung 87: Vergleich zwischen ETciD- und EThcD-MS/MS.	124
Abbildung 88: Vergleich von EThcD-Spektren der isobaren Peptide PP-4 und P ₂ -4.	125
Abbildung 89: Schema des datenabhängigen neutralverlustgetriggerten EThcD MS/MS-Ansatzes (DDNL-EThcD). ³⁰⁹	129
Abbildung 90: Identifizierung des Peptides (PP-4) in einem Spike-inexperiment mit Hilfe des DDNL- EThcD-Ansatzes.	130
Abbildung 91: Workflow zur Identifizierung endogener Proteinpyrophosphorylierungen in <i>S.cerevisiae</i>	131
Abbildung 92: Identifizierung der ersten endogenen Proteinpyrophosphorylierung.	132
Abbildung 93: Schema des datenabhängigen neutralverlustgetriggerten EThcD/HCD-Ansatzes (DDNL-EThcD/HCD) der zweiten Generation.	138
Abbildung 94: Erste endogene Proteinpyrophosphorylierung in humaner Zelllinie.	140
Abbildung 95: Dokumentation der endogenen Pyrophosphorylierung des Peptides YppSGAYGASVSDEELK mittels HCD- und EThcD-Spektren.	142
Abbildung 96: Nachweis der ersten endogenen Threoninpyrophosphorylierung.	143
Abbildung 97: Nachweis der ersten endogenen Threoninpyrophosphorylierung II.	144

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einziehungsliste des fokussierten Ansatzes zur Identifizierung eines endogenen pCys-Peptides.	48
Tabelle 2: Durchschnittlicher Sequest Xcorr Score, Identifizierungsrate, Anzahl an <i>unique</i> Peptiden und korrekt lokalisierten Phosphorylierungsstellen unter verschiedenen zusätzlichen Aktivierungen.	59
Tabelle 3: Relative Abundanz von pLys-Immoniumionen während der HCD-Fragmentierung.	99
Tabelle 4: Neutralverlustmuster isobarer di- und pyrophosphorylierter Peptide.	118
Tabelle 5: Gegenüberstellung wesentlicher Fragmentierungsparameter von CID und EThcD	126
Tabelle 6: Gegenüberstellung der wichtigsten Parameter der Triggermethoden 1. und 2. Generation	135
Tabelle 7: Relative Intensität und Top N des Neutralverlustes von 177,943 Da sowie die Signalintensität der identifizierten endogenen Pyrophosphopeptide.	141
Tabelle 8: Zusammenfassung aller endogene Proteinpyrophosphorylierungen und deren Herkunft.	146
Tabelle 9: Gradient der WCX zur Trennung von Proteinen.	161
Tabelle 10: Gradient der SAX zur Anreicherung von Phosphopeptiden.	162
Tabelle 11: Gradient der Fe ³⁺ -IMAC Phosphopeptidanreicherung.	164
Tabelle 12: Gradient 1 der basischen RPLC.	165
Tabelle 13: Gradient 2 der basischen RPLC.	165
Tabelle 14: Gradient der sauren RPLC.	166
Tabelle 15: Gradient der SAX zur Fraktionierung von pyrophosphorylierten Peptiden.	176

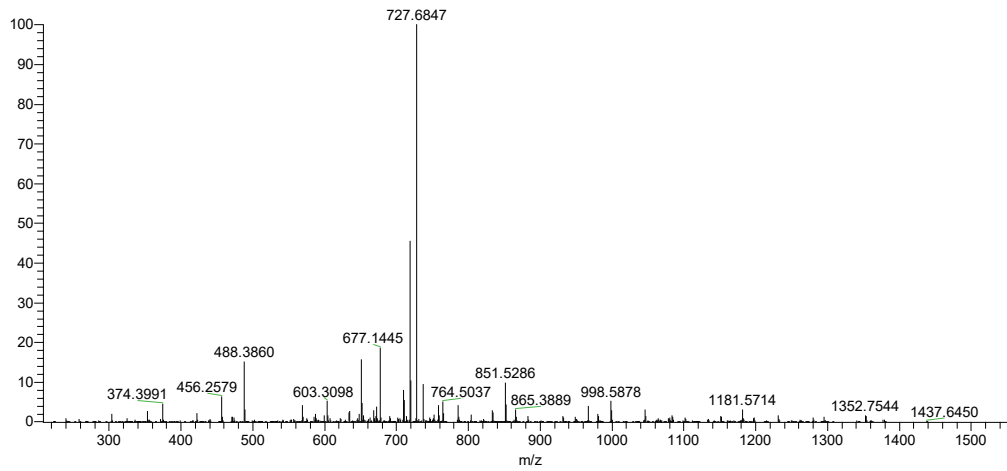
Datengrundlage

Anhangsverzeichnis

Tandemmassenspektrometrie von cysteinphosphorylierten Peptide.....	217
Identifizierung einer endogenen Cysteinphosphorylierung	220
Tandem-MS doppelt geladener, labil phosphorylierter Peptide	222
Statistische Datengrundlage	224
Charakterisierung von Proteinmodifikationen	230
Charakterisierung der pyrophosphorylierten D127pS-Myoglobinmutante	230
Charakterisierung der cysteinphosphorylierten Angiogenin S87C-Mutante	236
Charakterisierung von Antikörperwirkstoffkonjugaten	237
<i>Top-down</i> -Fragmentierung von Myoglobin.....	241
Strategien zur Identifizierung endogener Lysinphosphorylierungen	244
Proteomikansatz zur Identifizierung von pLy auf dem Histon H1.....	244
Proteomweite Identifizierung labiler Phosphorylierungen mit dem Fokus auf pLys	247
Identifizierte labile Phosphorylierungen in HEK293-Zellen	251
LC-MS-Analyse pyrophosphorylierter Peptide	254
Charakterisierung endogener Proteinpyrophosphorylierungen in <i>S. cerevisiae</i>	256
Charakterisierung endogener Proteinpyrophosphorylierungen in HEK 293	267
Literaturbekannte Phosphorylierungsstellen in HEK 293	299

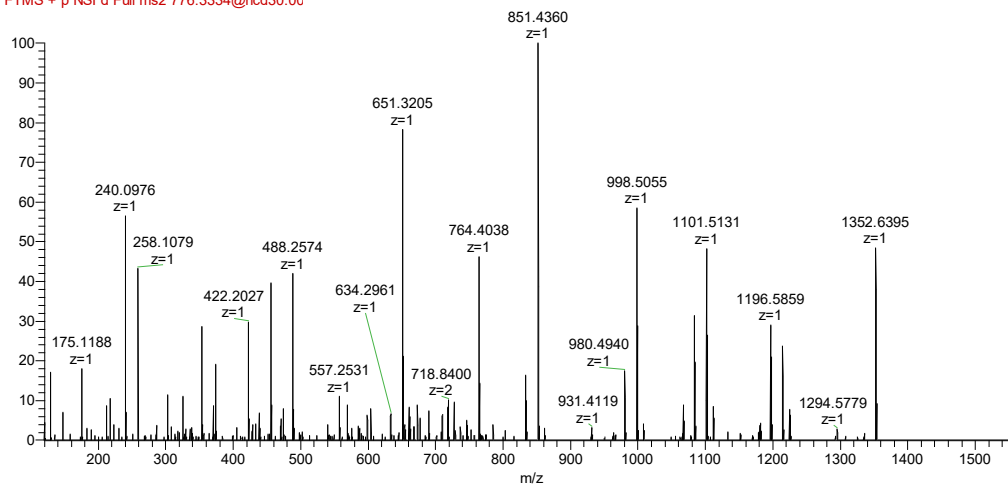
Tandemmassenspektrometrie von cysteinphosphorylierten Peptide

MP05_JB_315_1zu10_ETDhcd_sa10%_CID_HCD_OT #5317 RT: 36.52 AV: 1 NL: 2.36E5
F: ITMS + c NSI r d Full ms2 776.3334@cid35.00



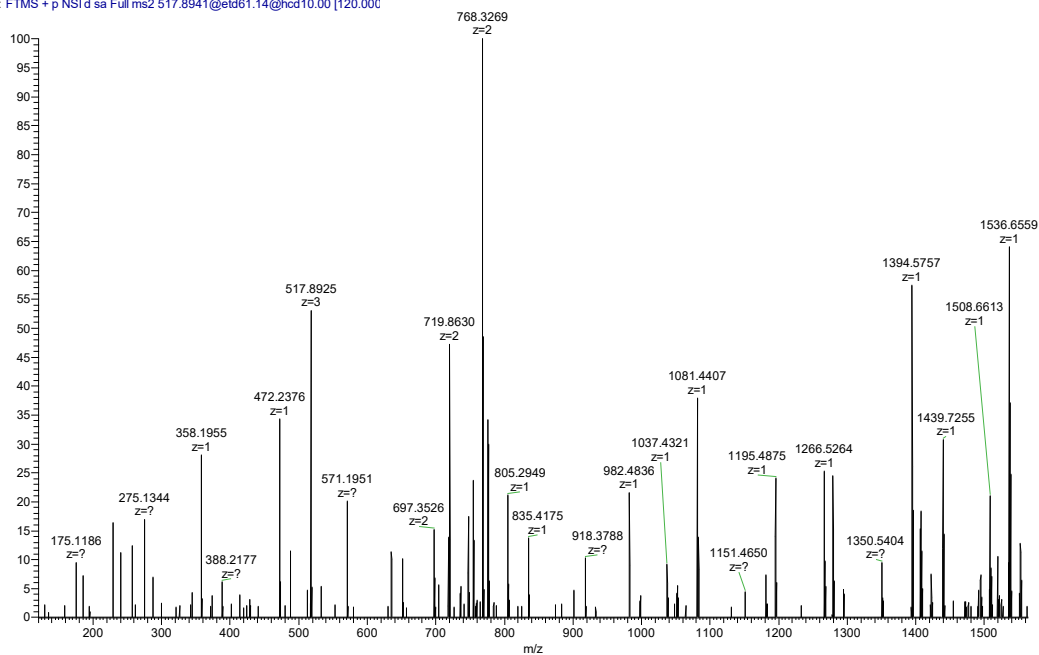
CID MS/MS Spektrum des doppelt protonierten, endogenen pCys Peptides EQLpCFSLYNAQR.

MP05_JB_315_1zu10_ETDhcd_sa10%_CID_HCD_OT #5318 RT: 36.52 AV: 1 NL: 7.20E5
F: FTMS + p NSI d Full ms2 776.3334@hcd30.00



HCD MS/MS Spektrum des doppelt protonierten, endogenen pCys Peptides EQLpCFSLYNAQR.

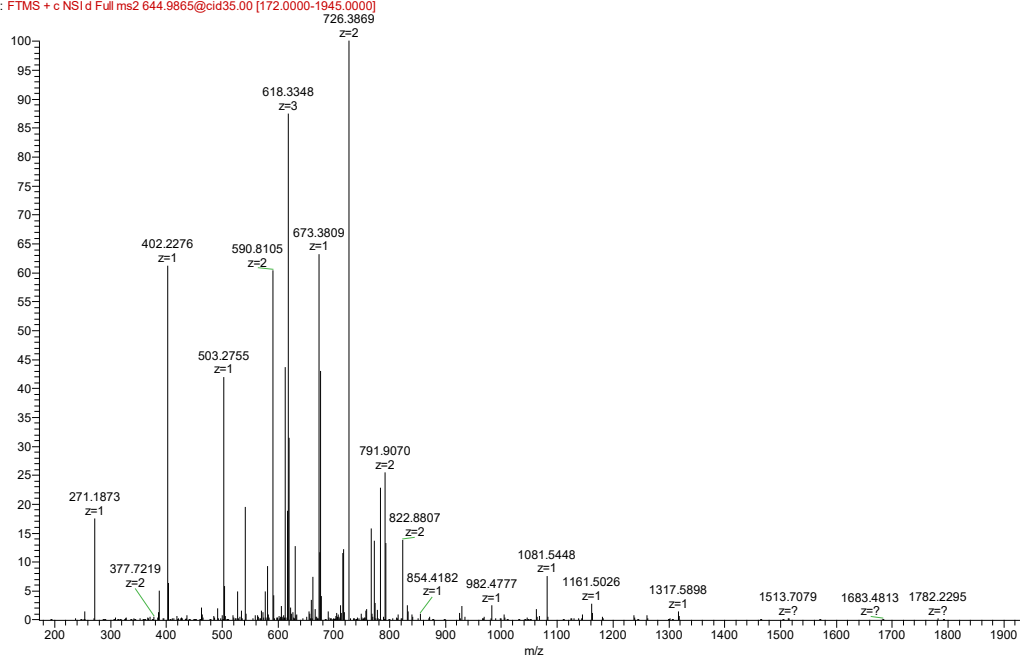
MP05_JB_315_1zu10_ETDhd_sa10%_HCD_OT_150814140008_#5120 RT: 35.96 AV: 1 NL: 5.30E4
T: FTMS + p NSI d sa Full ms2 517.8941@etd61.14@hcd10.00 [120.00]



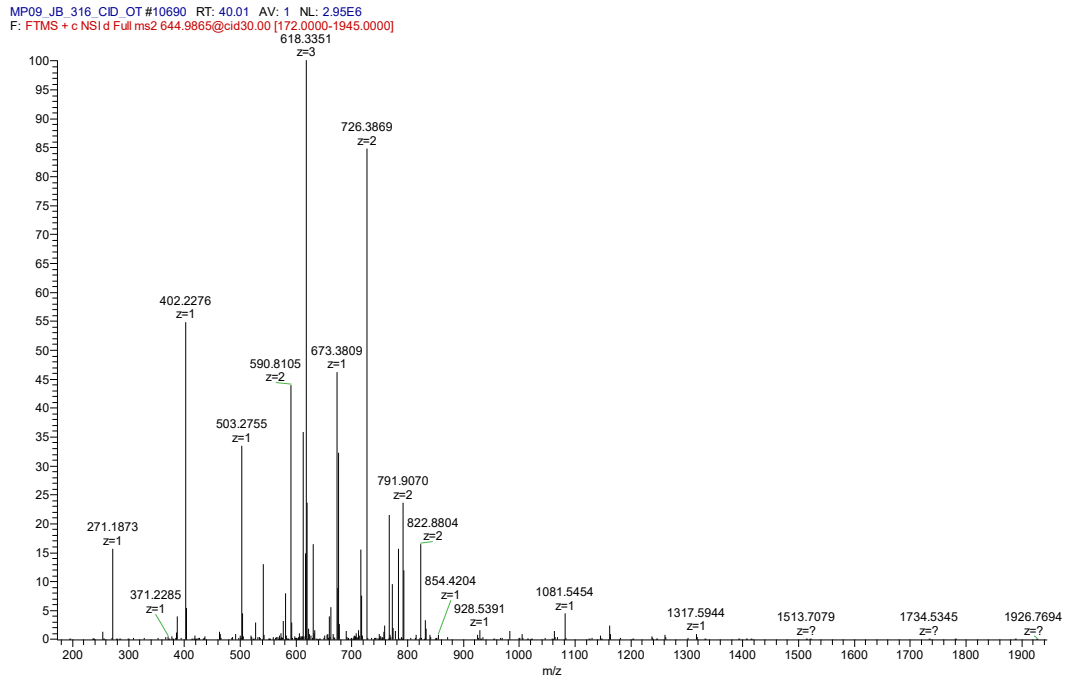
ETD MS/MS Spektrum des dreifach protonierten, endogenen pCys Peptides EQLpCFSLYNAQR.

Einfluss der normalisierten Kollisionsenergie auf die relativen Abundanzen der Neutralverluste

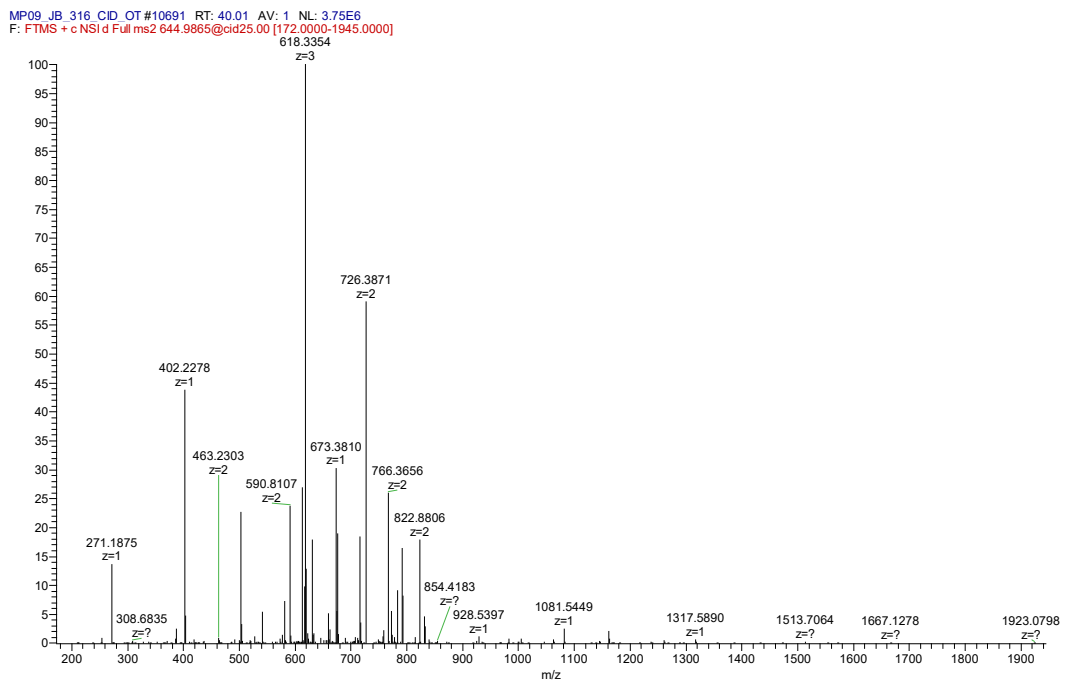
MP09_JB_316_CID_OT#10689 RT: 40.01 AV: 1 NL: 2.57E6
F: FTMS + c NSI d Full ms2 644.9865@cid35.00 [172.0000-1945.0000]



CID MS/MS Spektrum des dreifach protonierten Peptides IGIHSGSpCVAGVVGLTMPR mit einer NCE von 35%

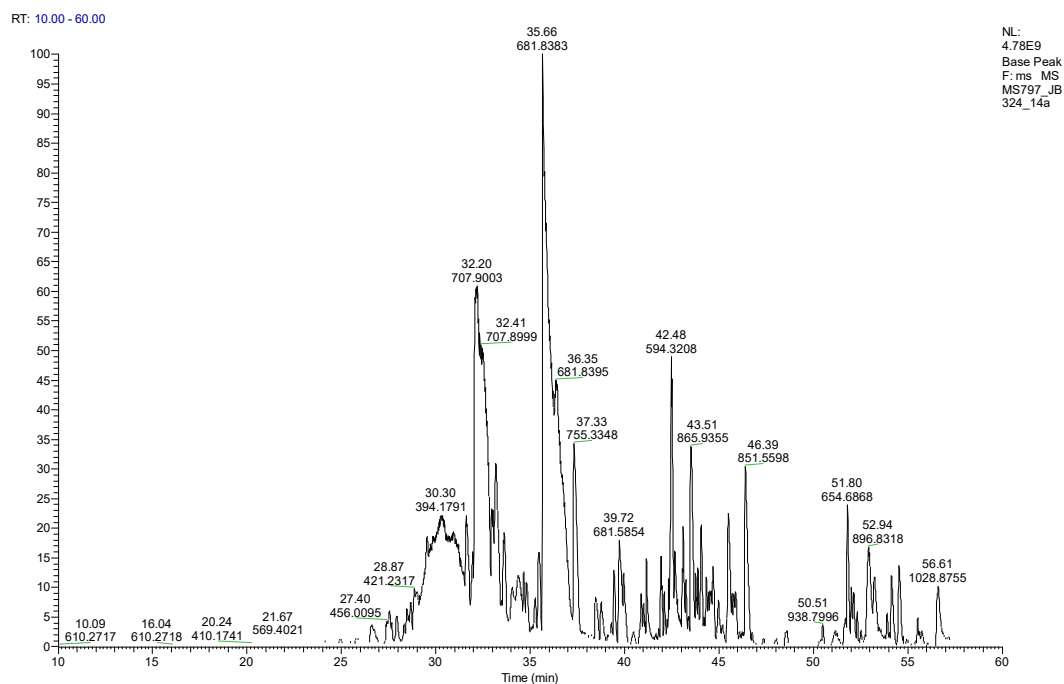


CID MS/MS Spektrum des dreifach protonierten Peptides IGIHSGSpCVAGVVGLTMPR mit einer NCE von 30%

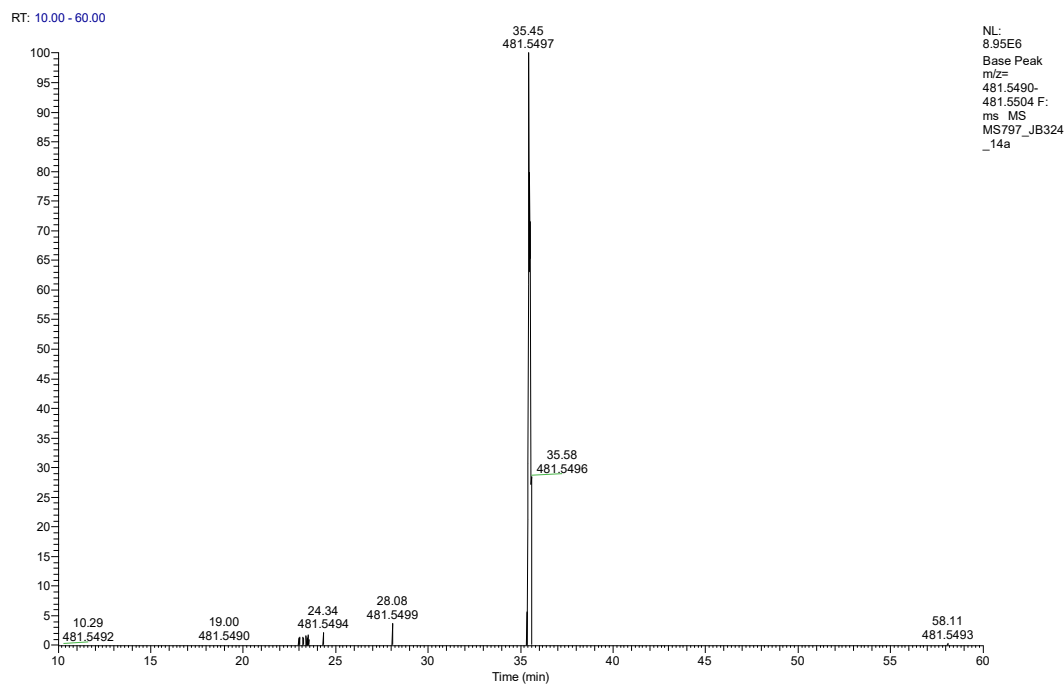


CID MS/MS Spektrum des dreifach protonierten Peptides IGIHSGSpCVAGVVGLTMPR mit einer NCE von 25%

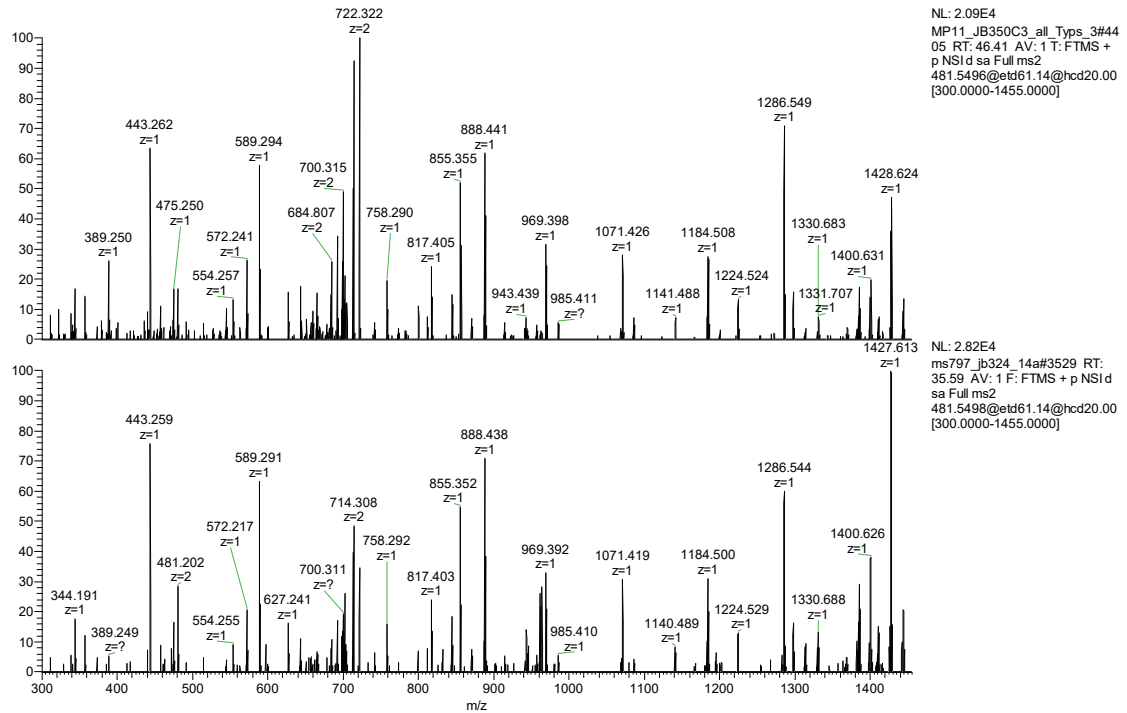
Identifizierung einer endogenen Cysteinphosphorylierung



TIC einer LC-Fraktion aus dem 2D-LC-MS-Ansatz.

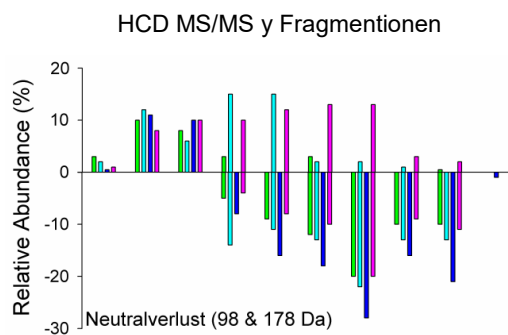
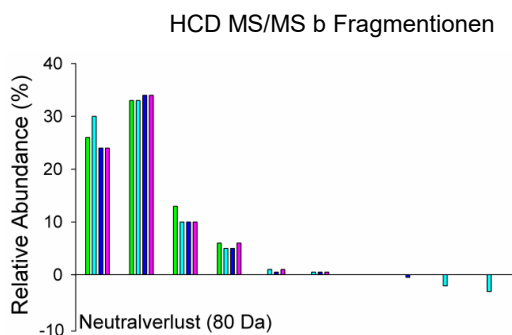


XIC des Precursorions (m/z 481,550) des endogenen pCys Peptides ENITNLDApCITR.

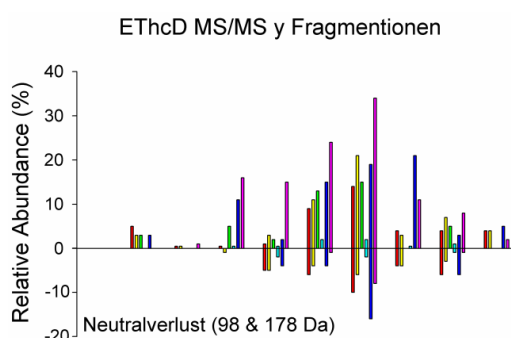
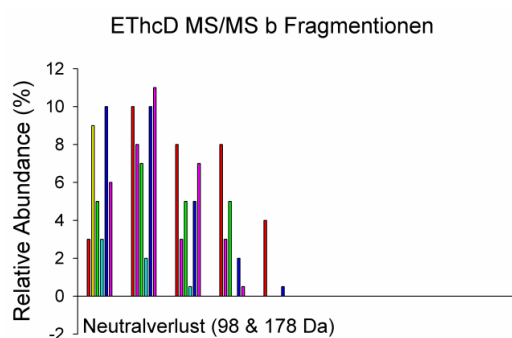


Nachweis der endogenen Cysteinphosphorylierung. Oben ist das Fragmentspektrum des synthetischen Peptides abgebildet und das des endogenen Peptides ENITNLDApCITR.

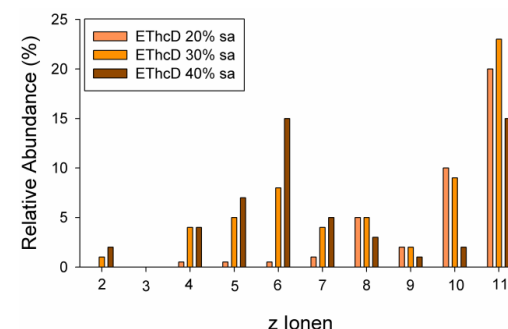
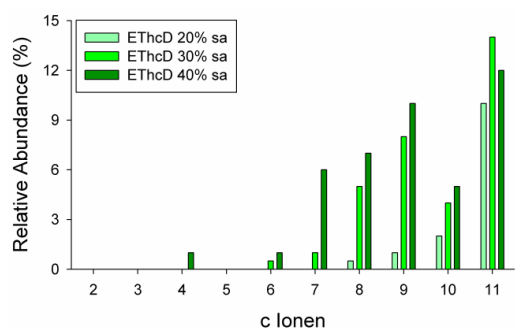
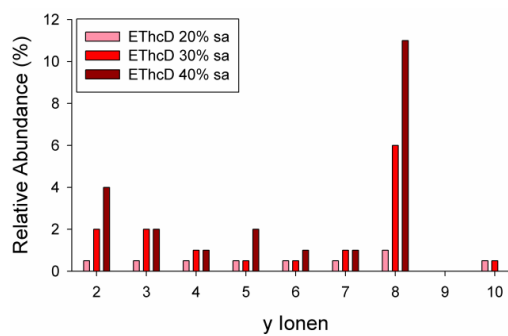
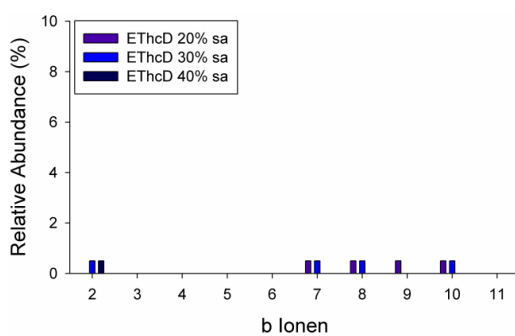
Tandem-MS doppelt geladener, labil phosphorylierter Peptide



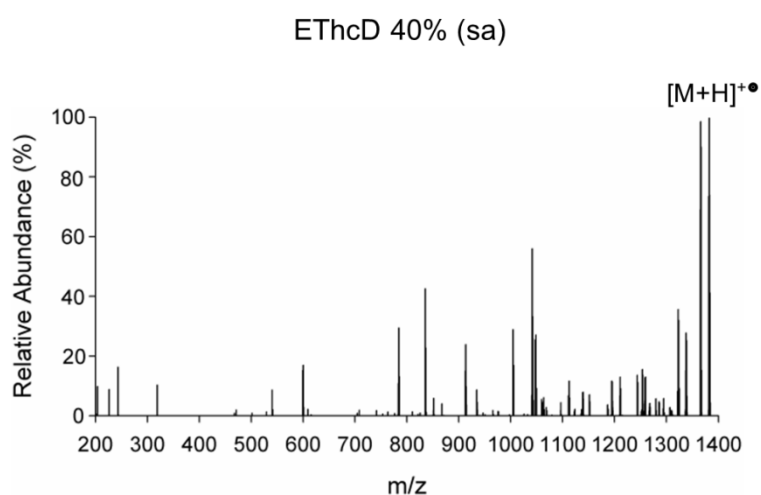
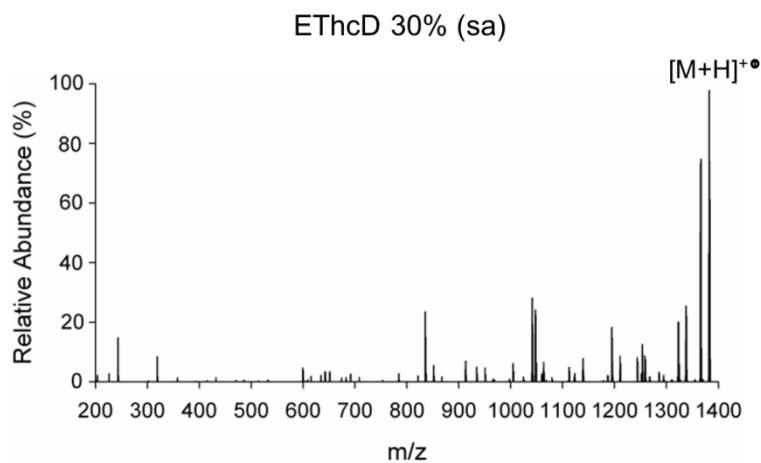
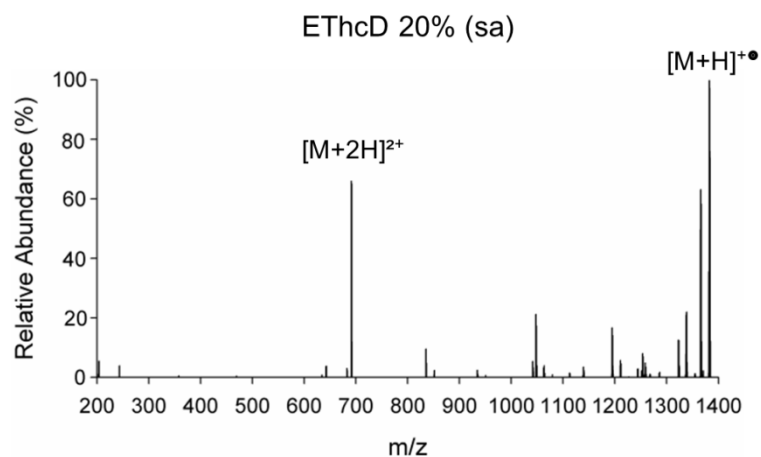
Relative Abundanz von Fragmentionen und ihren 80 Da Neutralverlustspezies der Peptide pArg2, pHis3, pCys2, pLys3 während HCD MS/MS.



Relative Abundanz von Fragmentionen und Neutralverlustspezies (98 & 178 Da) während ETHcD MS/MS.



Durchschnittliche relative Abundanz (%) der b-, c-, y- und z-Fragmentionen des Peptides **pHis4** unter Verwendung ladungsabhängiger ETD-Parameter (≈ 100 ms ETD-Reaktionszeit) und verschiedener sa.



EThcD MS/MS Spektrum des Peptides **pArg5**, gemessen mit ladungsabhängigen ETD-Parametern (≈ 100 ms ETD-Reaktionszeit) und verschiedenen zusätzlichen Aktivierungen.

Statistische Datengrundlage

Relative Abundanzen der Precursorionen unter Verwendung ladungsabhängiger ETD-Parameter (≈ 100 ms ETD-Reaktionszeit) und verschiedener zusätzlicher Aktivierungsenergien.

Peptid	Sequenz	[M+2H] ²⁺	Relative Abundanz Precursorion (%)					
			EThcD 20%	EThcD 25%	EThcD 30%	EThcD 35%	EThcD 40%	EThcD 50%
ppSer 1	TAVEIDppSDSLK	668.775	30	4	0	0	0	0
ppSer 2	TTAVEIDppSDSLK	719.299	29	4	0	0	0	0
ppSer 3	SSEDppSSEEDKA	736.722	26	5	0	0	0	0
ppThr 4	TTAVEIDppTDSLK	726.307	32	6	0	0	0	0
pHis 1	AVEIDpHDSLK	603.282	32	10	1	0	0	0
pHis 2	TAVEIDpHDSLK	653.806	36	12	0	0	0	0
pHis 3	TTAVEIDpHDSLK	704.328	40	12	0	0	0	0
pHis 4	FATpHGGYLLQGK	686.326	42	16	2	0	0	0
pHis 5	GGRTCpHAAILAR	652.823	36	28	12	2	0	0
pCys 1	AVEIDpCDSLK	586.257	28	2	0	0	0	0
pCys 2	TAVEIDpCDSLK	636.78	41	3	0	0	0	0
pCys 3	TTAVEIDpCDSLK	687.304	41	5	0	0	0	0
pCys 4	EQLpCFSLYNAQR	775.847	30	0	0	0	0	0
pCys 5	ENITNLDApCITR	721.821	46	1	0	0	0	0
pArg 1	TAVEIDpRDSLK	649.324	51	21	0	0	0	0
pArg 2	TTAVEIDpRDSLK	713.85	88	52	6	0	0	0
pArg 3	FTSEpRGYIVESK	747.852	70	46	12	0	0	0
pArg 4	GFLVpREQDPK	634.313	61	32	8	0	0	0
pArg 5	NGFLVpREQDPK	691.334	60	29	2	0	0	0
pLys 1	AVEIDpKDSLK	598.799	44	12	0	0	0	0
pLys 2	TAVEIDpKDSLK	649.324	57	20	0	0	0	0
pLys 3	TTAVEIDpKDSLK	699.847	65	16	0	0	0	0
pLys 4	LpKTEAEMK	514.746	76	65	20	1	0	0
pLys 5	HLpKTEAEMK	583.275	56	46	12	1	0	0
pLys 6	ALELFRpKDAAK	670.857	100	87	22	0	0	0
Durchschnitt			49	21	4	0	0	0

Relative Abundanz der ladungsreduzierten Precursorionen unter Verwendung ladungsabhängiger ETD-Parameter (≈ 100 ms ETD-Reaktionszeit) und verschiedener zusätzlicher Aktivierungsenergien.

Peptid	Sequenz	[M+2H] ²⁺	Relative Abundanz ladungsreduzierte Precursorion (%)					
			EThcD 20%	EThcD 25%	EThcD 30%	EThcD 35%	EThcD 40%	EThcD 50%
ppSer 1	TAVEIDppSDSLK	668.775	100	100	100	100	100	100
ppSer 2	TTAVEIDppSDSLK	719.299	100	100	100	80	80	82
ppSer 3	SSEDppSSEEDKA	736.722	100	100	100	100	100	100
ppThr 4	TTAVEIDppTDSLK	726.307	100	100	100	96	80	95
pHis 1	AVEIDpHDSLK	603.282	100	100	100	100	100	100
pHis 2	TAVEIDpHDSLK	653.806	100	100	100	100	100	100
pHis 3	TTAVEIDpHDSLK	704.33	100	100	100	100	100	100
pHis 4	FATpHGGYLLQGK	686.326	100	100	100	100	100	100
pHis 5	GGRTCpHAAILAR	652.823	100	100	100	100	100	100
pCys 1	AVEIDpCDSLK	586.257	100	100	88	74	60	54
pCys 2	TAVEIDpCDSLK	636.78	100	100	92	84	94	42
pCys 3	TTAVEIDpCDSLK	687.304	100	100	100	100	100	95
pCys 4	EQLpCFSLYNAQR	775.847	100	100	100	100	100	58
pCys 5	ENITNLDApCITR	721.821	100	100	100	90	66	30
pArg 1	TAVEIDpRDSLK	649.324	100	100	100	100	100	100
pArg 2	TTAVEIDpRDSLK	713.85	100	100	100	100	100	100
pArg 3	FTSEpRGYIVESK	747.852	100	100	100	100	100	100
pArg 4	GFLVpREQDPK	634.313	100	100	100	100	100	100
pArg 5	NGFLVpREQDPK	691.334	100	100	100	100	100	100
pLys 1	AVEIDpKDSLK	598.799	100	100	100	100	100	100
pLys 2	TAVEIDpKDSLK	649.324	100	100	100	100	100	100
pLys 3	TTAVEIDpKDSLK	699.847	100	100	100	100	100	100
pLys 4	LpKTEAEMK	514.746	100	100	100	100	88	72
pLys 5	HLpKTEAEMK	583.275	100	100	100	100	100	100
pLys 6	ALELFRpKDAAK	670.857	100	100	100	100	92	80
Durchschnitt			100	100	99	97	94	88

Anhang

Relative Abundanz der Neutralverluste ausgehend von den Precursorionen unter Verwendung ladungsabhängiger ETD-Parameter (≈ 100 ms ETD-Reaktionszeit) und verschiedener zusätzlicher Aktivierungsenergien.

Peptid	Sequenz	Relative Abundanz der Neutralverlust vom Precursorion (%)																	
		EThcD20%			EThcD25%			EThcD30%			EThcD35%			EThcD40%			EThcD50%		
		80	98	178	80	98	178	80	98	178	80	98	178	80	98	178	80	98	178
ppSer 1	TAVEIDppSDSLK	-	3	8	-	1	8	-	0	1	-	0	0	-	0	0	-	0	0
ppSer 2	TTAVEIDppSDSLK	-	3	8	-	1	8	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-	0	0
ppSer 3	SSEDppSSEEDKA	-	4	10	-	3	14	-	1	4	-	0	0	-	0	0	-	0	0
ppThr 4	TTAVEIDppTDSLK	-	3	4	-	3	6	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-	0	0
pHis 1	AVEIDpHDSLK	0	4	-	2	7	-	3	2	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-
pHis 2	TAVEIDpHDSLK	0	5	-	1	12	-	2	3	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-
pHis 3	TTAVEIDpHDSLK	0	5	-	1	12	-	2	2	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-
pHis 4	FATpHGGYLLQGK	8	2	-	8	10	-	13	6	-	5	2	-	0	0	-	0	0	-
pHis 5	GGRTCPHAAIAR	6	8	-	7	10	-	20	14	-	23	9	-	27	5	-	0	0	-
pCys 1	AVEIDpCDSLK	2	12	-	6	2	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-
pCys 2	TAVEIDpCDSLK	2	23	-	14	4	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-
pCys 3	TTAVEIDpCDSLK	2	20	-	13	3	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-
pCys 4	EQLpCFSLYNAQR	3	13	-	1	6	-	3	2	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-
pCys 5	ENITNLDApCITR	0	4	-	6	13	-	0	1	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-
pArg 1	TAVEIDpRDSLK	0	2	-	0	1	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-
pArg 2	TTAVEIDpRDSLK	0	3	-	1	7	-	3	4	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-
pArg 3	FTSEpRGYIVESK	0	1	-	2	6	-	8	6	-	2	1	-	0	0	-	0	0	-
pArg 4	GFLVpREQDPK	0	2	-	2	4	-	4	4	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-
pArg 5	NGFLVpREQDPK	0	2	-	2	8	-	6	4	-	1	0	-	0	0	-	0	0	-
pLys 1	AVEIDpKDSLK	0	2	-	0	1	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-
pLys 2	TAVEIDpKDSLK	0	2	-	0	1	-	0	1	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-
pLys 3	TTAVEIDpKDSLK	0	2	-	0	3	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-
pLys 4	LpKTEAEMK	0	1	-	1	0	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-
pLys 5	HLpKTEAEMK	0	2	-	1	38	-	4	7	-	4	3	-	0	0	-	0	0	-
pLys 6	ALELFRpKDAAK	0	8	-	2	39	-	12	40	-	8	16	-	0	1	-	0	1	-

Identifizierungsrate (%) und Anzahl an *unique* Peptiden unter Verwendung ladungsabhängiger ETD-Parameter (≈ 100 ms ETD-Reaktionszeit) und verschiedener zusätzlicher Aktivierungsenergien.

Peptid	Sequenz	Identifizierungsrate (%)						
		HCD	EThcD 20%	EThcD 25%	EThcD 30%	EThcD 35%	EThcD 40%	EThcD 50%
ppSer 1	TAVEIDppSDSLK	90.8	7.6	4.1	9.5	38.3	33.7	0
ppSer 2	TTAVEIDppSDSLK	99.5	12.7	33.2	56.5	69.5	82.8	83.6
ppSer 3	SSEDppSSEEDKA	73.5	100	100	100	100	100	50.0
ppThr 4	TTAVEIDppTDSLK	98.4	15.8	63.6	100	79.7	93.8	91.3
pHis 1	AVEIDpHDSLK	75.0	100	75.0	100	100	50.0	0
pHis 2	TAVEIDpHDSLK	100	80.0	26.7	75.0	80.0	5.9	5.9
pHis 3	TTAVEIDpHDSLK	100	100	10.7	88.9	92.9	6.7	6.7
pHis 4	FATpHGGYLLQGK	100	80.0	96.7	100	59.2	87.0	90.0
pHis 5	GGRTCPHAAIAR	45.4	0	28.6	83.3	83.3	100	100
pCys 1	AVEIDpCDSLK	0	87.5	16.7	16.7	0	0	0
pCys 2	TAVEIDpCDSLK	41.7	14.3	25.0	45.5	33.3	42.9	4.3
pCys 3	TTAVEIDpCDSLK	97.5	9.1	42.9	69.0	51.1	47.8	41.9
pCys 4	EQLpCFSLYNAQR	98.6	2.3	20.5	40.5	37.1	24.0	1.0
pCys 5	ENITNLDApCITR	100	42.9	42.9	50.0	22.2	0	5.6
pArg 1	TAVEIDpRDSLK	100	0	0	66.7	25.0	33.3	0
pArg 2	TTAVEIDpRDSLK	85.7	0	33.3	50.0	50.0	33.3	0
pArg 3	FTSEpRGYIVESK	100	16.7	16.7	80.0	100	50.0	37.5
pArg 4	GFLVpREQDPK	100	0	0	33.3	0	0	0
pArg 5	NGFLVpREQDPK	80.4	2.0	7.8	41.3	50.0	31.3	11.5
pLys 1	AVEIDpKDSLK	100	60.0	60.0	75.0	83.3	83.3	100
pLys 2	TAVEIDpKDSLK	92.7	75.0	75.0	85.7	88.9	85.7	66.7
pLys 3	TTAVEIDpKDSLK	100	50.0	73.0	83.3	82.2	78.0	82.4
pLys 4	LpKTEAEMK	100	14.3	37.5	66.6	22.2	44.4	57.9
pLys 5	HLpKTEAEMK	86.5	0	2.7	14.3	10.8	7.0	4.0
pLys 6	ALELFRpKDAAK	58.7	13.1	0	1.2	0	0	0
Durchschnittliche Identifizierungsrate		84.7	35.1	40.0	63.5	55.0	45.3	35.5
# <i>unique</i> Peptide		24/25	20/25	22/25	25/25	22/25	21/25	20/25

Anhang

ptmRS Positionswahrscheinlichkeit (%) und Anzahl korrekt identifizierter Phosphorylierungsstellen unter Verwendung ladungsabhängiger ETD-Parameter (≈ 100 ms ETD-Reaktionszeit) und verschiedener zusätzlicher Aktivierungsenergien.

Peptide	Sequenz	Identifizierte Phosphorylierungsstelle/ <i>ptmRS</i> Positionswahrscheinlichkeit (%)						
		HCD	EThcD 20%	EThcD 25%	EThcD 30%	EThcD 35%	EThcD 40%	EThcD 50%
ppSer 1	TAVEIDppSDSLK	pS7/pS9 (100:100)	pS7/pS9 (100:100)	ppS7 (100)	ppS7 (100)	ppS7 (100)	ppS7 (100)	-
ppSer 2	TTAVEIDppSDSLK	pS8/pS10 (100:100)	S8/S10 (100:100)	ppS8 (99.6)	ppS8 (100)	ppS8 (100)	ppS8 (100)	ppS8 (100)
ppSer 3	SSedppSSEEDKA	pS2/pS5 (100:100)	S5/S6 (100:100)	ppS5 (100) S5/S6 (100:100)	ppS5 (100) S5/S6 (100:100)	ppS5 (100) S5/S6 (100:100)	ppS5 (100) S5/S6 (100:100)	ppS5 (100) S5/S6 (100:100)
ppThr 4	TTAVEIDppTDSLK	pT8/pS10 (100:100)	T8/S10 (100:100)	ppT8 (99.6) (100:100)	ppT8 (100)	ppT8 (100)	ppT8 (100)	ppT8 (100)
pHis 1	AVEIDpHDSLK	pH6 (99.3)	pH6 (100)	pH6 (100)	pH6 (100)	pH6 (100)	pH6 (100)	-
pHis 2	TAVEIDpHDSLK	pT1 (100)	pH7 (100)	pH7 (99.6)	pH7 (99.6)	pH7 (100)	-	-
pHis 3	TTAVEIDpHDSLK	pS10 (100)	pS10 (100)	pS10 (100)	pH8/pS10 (50:50)	pH8 (100)	pH8 (100)	pT1 (100)
pHis 4	FATpHGYYLLQGK	pT3 (100)	pH4 (100)	pH4 99.6	pT3/pH4 (50:50)	pT3/pH4 (50:50)	pH4 (99.6)	pT3/pH4 (50:50)
pHis 5	GGRTCPHAAIAR	pR12 (99.9)	-	pT4 (98.5)	pT4/pC5 (50:50)	pT4/pC5 (49.8:49.8)	pT4/pC5 (49.8:49.8)	pT4/pC5 (49.8:49.8)
pCys 1	AVEIDpCDSLK	-	pC6 (100.0)	pC6 (100.0)	pC6 (100.0)	pC6 (100.0)	-	-
pCys 2	TAVEIDpCDSLK	pT1/pC7 (50:50)	pS9 (100)	pC7 (100.0)	pC7 (100.0)	pC7 (100.0)	pC7 (100.0)	pC7 (100.0)
pCys 3	TTAVEIDpCDSLK	pT1/pT2 (50:50) pC8 (100)	pC8/pS10 (50:50)	pC8 (100.0)	pC8 (100.0)	pC8 (100.0)	pC8 (100.0)	pC8 (100.0)
pCys 4	EQLpCFSLYNAQR	pC4 (99.5)	pC4 (100)	pC4 (100)	pC4 (100)	pC4 (100)	pC4 (100)	pC4 (100)
pCys 5	ENITNLDApCITR	pT4 (100)	-	pT11 (100)	pT11 (100)	-	-	-
pArg 1	TAVEIDpRDSLK	pR7 (100)	-	-	pR7 (100)	pR7 (100)	pR7 (100)	-
pArg 2	TTAVEIDpRDSLK	pR8 (100)	-	pR8 (100)	pR8 (100)	pR8 (100)	pR8 (100)	-
pArg 3	FTSEpRGYIVESK	pS3 (98.9)	pR5 (100)	pR5 (100)	pR5 (100)	pR5 (100)	pR5 (100)	-
pArg 4	GFLVpREQDPK	pR5 (100)	-	pR5 (100)	pR5 (100)	pR5 (100)	pR5 (100)	pR5 (100)
pArg 5	NGFLVpREQDPK	pR6 (99.4)	pR6 (100)	pR6 (100)	pR6 (100)	pR6 (100)	pR6 (100)	pR6 (100)
pLys 1	AVEIDpKDSLK	pK6 (99.1)	pK6 (100)	pK6 (100)	pK6 (100)	pK6 (100)	pK6 (100)	pK6 (100)
pLys 2	TAVEIDpKDSLK	pK7 (99.1)	pK7 (100)	pK7 (100)	pK7 (100)	pK7 (100)	pK7 (100)	pK7 (100)
pLys 3	TTAVEIDpKDSLK	pK8 (99.2)	pK8 (99.6)	pK8 (100)	pK8 (100)	pK8 (100)	pK8 (100)	pK8 (100)
pLys 4	LpKTEAEMK	pK2 (99.7)	pK2 (100)	pK2 (100)	pK2 (100)	pK2 (100)	pK2 (100)	pK2 (100)
pLys 5	HLpKTEAEMK	pH1/pK3/pT4 (33/33/33)	-	pK3 (100)	pK3 (100)	pK3 (100)	pK3 (100)	pK3 (100)
pLys 6	ALELFRpKDAAK	pK7 (99.5)	pR6 (100)	-	pK7 (99.7)	-	-	-
# Phosphorylierungsstellen mit <i>ptmRS</i> Positionswahrscheinlichkeit >99%		21/25	17/25	21/25	22/25	21/25	20/25	14/25
# Korrekt lokalisierte Phosphorylierungsstelle		13/25	11/25	20/25	21/25	20/25	19/25	13/25

Anhang

Durchschnittlicher Sequest Xcorr Score der identifizierten Peptide und Anzahl an *unique* Peptiden unter Verwendung von 30% NCE zusätzlicher Aktivierung und verschiedenen ETD-Reaktionszeiten.

Peptid	Sequenz	Durchschnittlicher Sequest Xcorr Score/Identifizierungsrate (%)			
		75ms	≈100ms	125ms	150ms
ppSer 1	TAVEIDppSDSLK	3.99/47.1	3.6/9.5	3.55/41.7	3.60/30.8
ppSer 2	TTAVEIDppSDSLK	4.37/80.9	3.83/56.5	3.86/67.4	3.49/54.2
ppSer 3	SSEDppSSEEDKA	4.85/0.774	4.35/100	3.46/85.7	3.82/71.4
ppThr 4	TTAVEIDppTDSLK	/67.7	3.91/100	3.95/67.7	3.62/67.7
pHis 1	AVEIDpHDSLK	4.44/100	4.26/100	3.79/50.0	3.72/50.0
pHis 2	TAVEIDpHDSLK	4.57/69.2	4.41/75.0	3.87/61.5	3.76/57.1
pHis 3	TTAVEIDpHDSLK	4.61/100	3.92/88.9	4.06/88.0	4.05/87.5
pHis 4	FATpHGGYLLQGK	5.05/50.0	4.79/100	3.47/94.1	4.00/96.8
pHis 5	GGRTCpHAAILAR	3.23/75.0	2.84/83.3	3.05/100	2.31/100
pCys 1	AVEIDpCDSLK	-/0	4.02/16.7	3.65/66.7	3.75/16.7
pCys 2	TAVEIDpCDSLK	4.66/33.3	3.91/45.5	3.95/38.5	3.71/33.3
pCys 3	TTAVEIDpCDSLK	4.96/74.4	4.24/69.0	4.16/65.8	3.93/55.6
pCys 4	EQLpCFSLYNAQR	4.88/61.9	4.04/40.5	3.81/44.7	3.78/9.0
pCys 5	ENITNLDApCITR	4.82/6.7	4.61/50.0	-/0	-/0
pArg 1	TAVEIDpRDSLK	4.96/50.0	4.36/66.7	4.76/33.3	3.52/33.3
pArg 2	TTAVEIDpRDSLK	5.38/66.7	4.54/50.0	4.26/75.0	3.89/42.9
pArg 3	FTSEpRGYIVESK	5.19/83.3	4.42/80.0	4.71/71.4	4.82/66.7
pArg 4	GFLVpREQDPK	-/0	3.62/33.3	3.56/33.3	-/0
pArg 5	NGFLVpREQDPK	4.82/40.4	4.16/41.3	4.04/41.7	3.94/23.9
pLys 1	AVEIDpKDSLK	4.98/83.3	4.78/75.0	4.32/100	4.53/60.0
pLys 2	TAVEIDpKDSLK	4.99/90.0	4.42/85.7	4.43/100	4.07/100
pLys 3	TTAVEIDpKDSLK	5.58/84.1	4.79/83.3	4.72/87.7	4.34/75.4
pLys 4	LpKTEAEMK	4.49/12.5	4.18/66.6	4.30/50.0	4.03/66.7
pLys 5	HLpKTEAEMK	4.66/9.3	3.9/14.3	3.87/22.4	3.86/5.4
pLys 6	ALELFRpKDAAK	-/0	3.72/1.2	3.71/4.0	3.85/1.6
Durchschnittlicher Sequest Xcorr Score		4.82	4.17	3.99	3.85
Durchschnittliche Identifizierungsrate		54.8	63.5	60.4	49.0
# <i>unique</i> Peptide		22/25	25/25	24/25	23/25

*ptm*RS Positionswahrscheinlichkeit (%) und Anzahl korrekt identifizierter Phosphorylierungsstellen unter Verwendung von 30% zusätzlicher Aktivierungsenergie und verschiedenen ETD-Reaktionszeiten.

Peptide	Sequence	Identifizierte Phosphorylierungsstelle/ <i>ptm</i> RS Positionswahrscheinlichkeit (%)			
		75ms	≈100ms	125ms	150ms
ppSer 1	TAVEIDppSDSLK	-	ppS7 (100)	ppS7 (100)	ppS7 (100)
ppSer 2	TTAVEIDppSDSLK	ppS8 (100)	ppS8 (100)	ppS8 (100)	ppS8 (100)
ppSer 3	SSEDppSSEEDKA	ppS5 (100)	ppS5 (100)	ppS5 (100)	ppS5 (100)
ppThr 4	TTAVEIDppTDSLK	ppT (100)	ppT8 (100)	ppT (100)	ppT (100)
pHis 1	AVEIDpHDSLK	pH6 (100)	pH6 (100)	pH6 (100)	pH6 (100)
pHis 2	TAVEIDpHDSLK	pH7 100.0	pH7 (99.6)	pH7 100.0	pH7 100.0
pHis 3	TTAVEIDpHDSLK	pS10 (99.5)	pH8/pS10 (50:50)	pH8/pS10 (50:50)	pS10 (100)
pHis 4	FATpHGGYLLQGK	pT3 (100)	pT3/pH4 (50:50)	pT3/pH4 (50:50)	pT3/pH4 (50:50)
pHis 5	GGRTCpHAAILAR	pC5 (98.6)	pT4/pC5 (50:50)	pT4/pC5 (49.8:49.8)	pC5 (98.5)
pCys 1	AVEIDpCDSLK	-	pC6 (100.0)	pC6 100.0	pC6 100.0
pCys 2	TAVEIDpCDSLK	pC7 (100.0)	pC7 (100.0)	pC7 (100.0)	pC7 (100.0)
pCys 3	TTAVEIDpCDSLK	pC8 (100.0)	pC8 (100.0)	pC8 (100.0)	pC8 (100.0)
pCys 4	EQLpCFSLYNAQR	pC4 (100)	pC4 (100)	pC4 (100)	pC4 (100)
pCys 5	ENITNLDApCITR	-	pT11 (100)	-	-
pArg 1	TAVEIDpRDSLK	pR7 (100)	pR7 (100)	pR7 (100)	pR7 (100)
pArg 2	TTAVEIDpRDSLK	pR8 (100)	pR8 (100)	pR8 (100)	pR8 (100)
pArg 3	FTSEpRGYIVESK	pR5 (100)	pR5 (100)	pR5 (100)	pR5 (100)
pArg 4	GFLVpREQDPK	-	pR5 (100)	pR5 (100)	pR5 (100)
pArg 5	NGFLVpREQDPK	pR6 (100)	pR6 (100)	pR6 (100)	pR6 (100)
pLys 1	AVEIDpKDSLK	pK6 (100)	pK6 (100)	pK6 (100)	pK6 (100)
pLys 2	TAVEIDpKDSLK	pK7 (100)	pK7 (100)	pK7 (100)	pK7 (100)
pLys 3	TTAVEIDpKDSLK	pK8 (100)	pK8 (100)	pK8 (100)	pK8 (100)
pLys 4	LpKTEAEMK	pK2 (100)	pK2 (100)	pK2 (100)	pK2 (100)
pLys 5	HLpKTEAEMK	pK3 (100)	pK3 (100)	pK3 (100)	pK3 (100)
pLys 6	ALELFRpKDAAK	-	pK7 (99.7)	pK7 (99.7)	pK7 (100)
# Phosphorylierungsstelle mit <i>ptm</i> RS Positionswahrscheinlichkeit >99%		19/25	22/25	21/25	21/25
# Korrekt lokalisierte Phosphorylierungsstellen		12/25	22/25	21/25	21/25

Anhang

Durchschnittlicher Sequest Xcorr score der identifizierten Peptide und die Anzahl an Peptiden bei 30% sa, ladungsabhängigen ETD Parametern und verschiedenen AGC-Targetwerten.

Peptide	Sequenz	Average Sequest Xcorr score/identification rate (%)			
		3e4	4e4	5e4	1e5
ppSer 1	TAVEIDppSDSLK	-/0	-/0	3.6/9.5	3.90/21.8
ppSer 2	TTAVEIDppSDSLK	3.64/1.2	3.70/10.8	3.83/56.5	4.31/78.3
ppSer 3	SSDppSSEEDKA	4.21/100	4.03/100	4.35/100	4.29/100
ppThr 4	TTAVEIDppTDSLK	3.64/3.3	3.83/9.1	3.91/100	4.47/96.7
pHis 1	AVEIDpHDSLK	3.71/16.7	-/0	4.26/100	4.05/75.0
pHis 2	TAVEIDpHDSLK	3.82/6.3	3.87/33.3	4.41/75.0	4.37/33.3
pHis 3	TTAVEIDpHDSLK	4.13/1.2	3.84/10.2	3.92/88.9	4.19/58.1
pHis 4	FATpHGGYLLQGK	4.34/83.3	4.13/96.8	4.79/100	4.28/100
pHis 5	GGRTCpHAIIAR	2.12/100	2.27/100	2.84/83.3	3.52/100
pCys 1	AVEIDpCDSLK	-/0	-/0	4.02/16.7	4.04/83.3
pCys 2	TAVEIDpCDSLK	-/0	4.22/33.3	3.91/45.5	4.25/46.2
pCys 3	TTAVEIDpCDSLK	4.18/010.4	4.47/60.5	4.24/69.0	4.95/94.9
pCys 4	EQLpCFSLYNAQR	4.33/1.0	4.26/25.3	4.04/40.5	4.36/65.8
pCys 5	ENITNLDApCITR	-/0	4.27/40	4.61/50.0	4.44/57.1
pArg 1	TAVEIDpRDSLK	4.11/33.3	-/0	4.36/66.7	4.37/66.7
pArg 2	TTAVEIDpRDSLK	4.79/40.0	4.86/50.0	4.54/50.0	4.92/66.7
pArg 3	FTSEpRGYIVESK	4.97/50.0	4.95/66.7	4.42/80.0	4.78/100
pArg 4	GFLVpREQDPK	-/0	-/0	3.62/33.3	4.38/33.3
pArg 5	NGFLVpREQDPK	4.32/10.3	4.35/21.2	4.16/41.3	4.67/58.3
pLys 1	AVEIDpKDSLK	4.32/66.6	4.70/80.0	4.78/75.0	4.96/100
pLys 2	TAVEIDpKDSLK	4.18/62.5	4.44/88.9	4.42/85.7	4.84/100
pLys 3	TTAVEIDpKDSLK	4.48/55.3	4.82/79.7	4.79/83.3	5.18/88.7
pLys 4	LpKTEAEMK	4.32/37.5	4.12/25.0	4.18/66.7	4.36/66.7
pLys 5	HLpKTEAEMK	4.23/1.3	4.22/9.2	3.9/14.3	4.18/31.8
pLys 6	ALELFRpKDAAK	-/0	-/0	3.72/1.2	4.00
Durchschnittlicher Sequest Xcorr Score		4.10	4.18	4.17	4.42
Durchschn. Identifizierungsrate		28.3	39.2	63.5	71.0
# unique Peptide		19/25	19/25	25/25	25/25

ptmRS Positionswahrscheinlichkeit (%) und Anzahl an korrekt lokalisierten Phosphorylierungsstellen. Die Daten wurden mit 30% sa, ladungsabhängigen ETD Parametern und verschiedenen AGC-Targetwerten ermittelt.

Peptide	Sequenz	Assigned phosphosite/ <i>ptmRS</i> site probability (%)			
		3e4	4e4	5e4	1e5
ppSer 1	TAVEIDppSDSLK	-	-	ppS7 (100)	ppS7 (100)
ppSer 2	TTAVEIDppSDSLK	ppS8 (100)	ppS8 (100)	ppS8 (100)	ppS8 (100)
ppSer 3	SSDppSSEEDKA	ppS5 (100)	ppS5 (100)	ppS5 (100)	ppS5 (100)
ppThr 4	TTAVEIDppTDSLK	ppT8 (100)	ppT8 (100)	ppT8 (100)	ppT8 (100)
pHis 1	AVEIDpHDSLK	pH6 (100)	-	pH6 (100)	pH6 (100)
pHis 2	TAVEIDpHDSLK	pH7 (100)	pH7 (100)	pH7 (99.6)	pH7 (100)
pHis 3	TTAVEIDpHDSLK	pS10 (100)	pS10 (100)	pH8/pS10 (50:50)	pS10 (100)
pHis 4	FATpHGGYLLQGK	pT3/pH4 (50:50)	pT3/pH4 (50:50)	pT3/pH4 (50:50)	T3/H4 (50:50)
pHis 5	GGRTCpHAIIAR	pT4/pC5 (49.8:49.8)	pT4/pC5 (49.8:49.8)	pT4/pC5 (50:50)	pT4/pC5 (49.8:49.8)
pCys 1	AVEIDpCDSLK	-	-	pC6 (100.0)	pC6 (100)
pCys 2	TAVEIDpCDSLK	-	pC7 (100)	pC7 (100.0)	pC7 (100)
pCys 3	TTAVEIDpCDSLK	pC8 (100)	pC8 (100)	pC8 (100.0)	pC8 (100)
pCys 4	EQLpCFSLYNAQR	pC4 (100)	pC4 (100)	pC4 (100)	pC4 (100)
pCys 5	ENITNLDApCITR	-	pT11 (100)	pT11 (100)	pC9 (100)
pArg 1	TAVEIDpRDSLK	pR7 (100)	-	pR7 (100)	pR7 (100)
pArg 2	TTAVEIDpRDSLK	pR8 (100)	pR8 (100)	pR8 (100)	pR8 (100)
pArg 3	FTSEpRGYIVESK	pR5 (100)	pR5 (100)	pR5 (100)	pR5 (100)
pArg 4	GFLVpREQDPK	-	-	pR5 (100)	pR5 (100)
pArg 5	NGFLVpREQDPK	pR6 (100)	pR6 (100)	pR6 (100)	pR6 (100)
pLys 1	AVEIDpKDSLK	pK6 (100)	pK6 (100)	pK6 (100)	pK6 (100)
pLys 2	TAVEIDpKDSLK	pK7 (100)	pK7 (100)	pK7 (100)	pK7 (100)
pLys 3	TTAVEIDpKDSLK	pK8 (100)	pK8 (100)	pK8 (100)	pK8 (100)
pLys 4	LpKTEAEMK	pK2 (100)	pK2 (100)	pK2 (100)	pK2 (100)
pLys 5	HLpKTEAEMK	pK3 (100)	pK3 (100)	pK3 (100)	pK3 (100)
pLys 6	ALELFRpKDAAK	-	-	pK7 (99.7)	pK7 (99.7)
# Phosphorylierungsstelle mit <i>ptmRS</i> Positionswahrscheinlichkeit >99%		17/25	17/25	22/25	22/25
#Korrekt lokalisierte Phosphorylierungsstellen		16/25	15/25	21/25	22/25

Anhang

Relative Abundanz der Neutralverluste ausgehend vom Precursorion während der HCD-Fragmentierung.

Peptid	Sequenz	Relative Abundanz der Neutralverluste ausgehend von Precursorion (%)				
		NL 80 Da	NL 98 Da	NL 116 Da	NL 178 Da	NL 196 Da
ppSer 1	TAVEIDppSDSLK	-	-	-	-	-
ppSer 2	TTAVEIDppSDSLK	-	-	-	<1	1
ppSer 3	SSEDppSSEEDKA	-	-	-	-	-
ppThr 4	TTAVEIDppTDSLK	-	-	-	-	-
pHis 1	AVEIDpHDSLK	10	8	2	-	-
pHis 2	TAVEIDpHDSLK	2	2	1	-	-
pHis 3	TTAVEIDpHDSLK	64	16	10	-	-
pHis 4	FATpHGGYLLQGK	65	15	8	-	-
pHis 5	GGRTCpHAAILAR	100	16	4	-	-
pCys 1	AVEIDpCDSLK	-	-	-	-	-
pCys 2	TAVEIDpCDSLK	-	-	-	-	-
pCys 3	TTAVEIDpCDSLK	-	-	-	-	-
pCys 4	EQLpCFSLYNAQR	-	<1	1	-	-
pCys 5	ENITNLDApCITR	-	<1	<1	-	-
pArg 1	TAVEIDpRDSLK	2	2	<1	-	-
pArg 2	TTAVEIDpRDSLK	12	10	7	-	-
pArg 3	FTSEpRGYIVESK	4	2	<1	-	-
pArg 4	GFLVpREQDPK	5	3	2	-	-
pArg 5	NGFLVpREQDPK	5	4	3	-	-
pLys 1	AVEIDpKDSLK	<1	<1	<1	-	-
pLys 2	TAVEIDpKDSLK	2	3	<1	-	-
pLys 3	TTAVEIDpKDSLK	-	-	-	-	-
pLys 4	LpKTEAEMK	30	26	8	-	-
pLys 5	HLpKTEAEMK	62	100	39	-	-
pLys 6	ALELFRpKDAAK	63	100	41	-	-

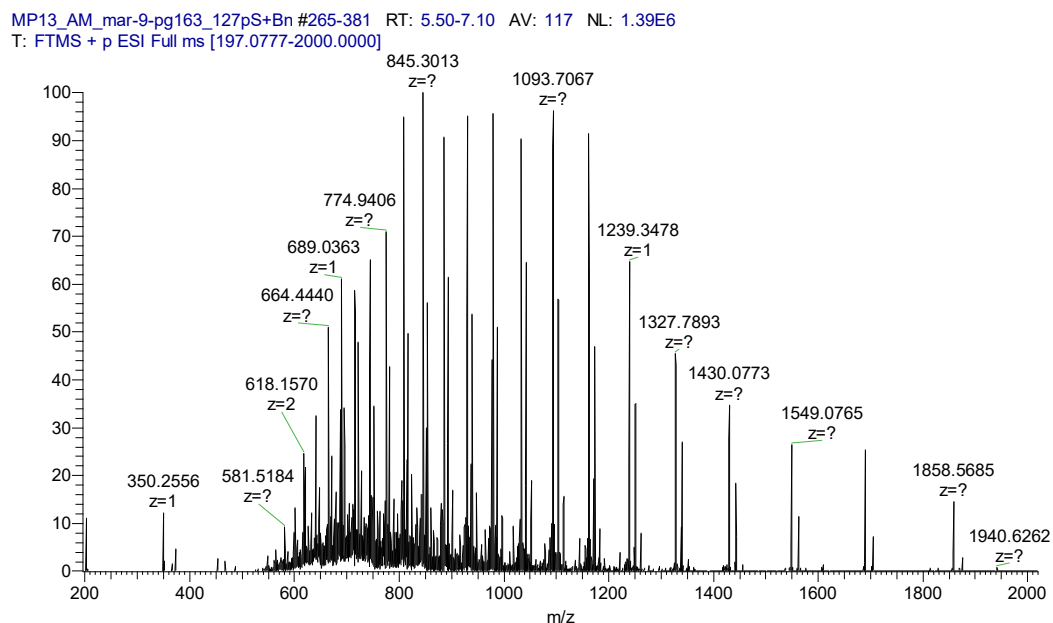
Relative Abundanz von Phosphoimmoniumionen und deren Masse-zu-Ladungsverhältnisse.

Peptid	Sequenz	Relative Abundanz der Phosphoimmoniumionen (%)	m/z
ppSer 1	TAVEIDppSDSLK	-	218.978
ppSer 2	TTAVEIDppSDSLK	-	218.978
ppSer 3	SSEDppSSEEDKA	-	218.978
ppThr 4	TTAVEIDppTDSLK	-	218.978
pHis 1	AVEIDpHDSLK	-	190.038
pHis 2	TAVEIDpHDSLK	-	190.038
pHis 3	TTAVEIDpHDSLK	-	190.038
pHis 4	FATpHGGYLLQGK	-	190.038
pHis 5	GGRTCpHAAILAR	-	190.038
pCys 1	AVEIDpCDSLK	-	155.988
pCys 2	TAVEIDpCDSLK	-	155.988
pCys 3	TTAVEIDpCDSLK	-	155.988
pCys 4	EQLpCFSLYNAQR	-	155.988
pCys 5	ENITNLDApCITR	-	155.988
pArg 1	TAVEIDpRDSLK	-	209.080
pArg 2	TTAVEIDpRDSLK	-	209.080
pArg 3	FTSEpRGYIVESK	-	209.080
pArg 4	GFLVpREQDPK	-	209.080
pArg 5	NGFLVpREQDPK	-	209.080
pLys 1	AVEIDpKDSLK	6 / 1	164.048 / 181.074
pLys 2	TAVEIDpKDSLK	4 / <1	164.048 / 181.074
pLys 3	TTAVEIDpKDSLK	3 / <1	164.048 / 181.074
pLys 4	LpKTEAEMK	<1 / -	164.048 / 181.074
pLys 5	HLpKTEAEMK	38 / 8	164.048 / 181.074
pLys 6	ALELFRpKDAAK	<1 / -	164.048 / 181.074

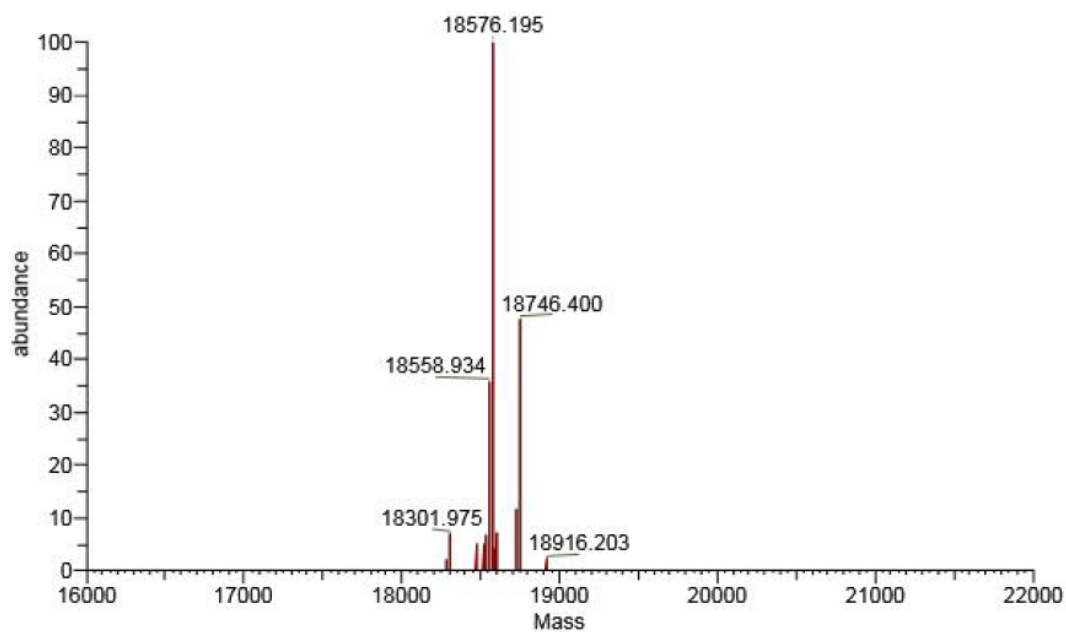
Charakterisierung von Proteinmodifikationen

Charakterisierung der pyrophosphorylierten D127pS-Myoglobinmutante

Ergebnisse der LC-MS-Analyse der intakten Myoglobinmutante



MS¹ Übersichtsspektrum der intakten Myoglobinmutante Myo-D127ppSBn.

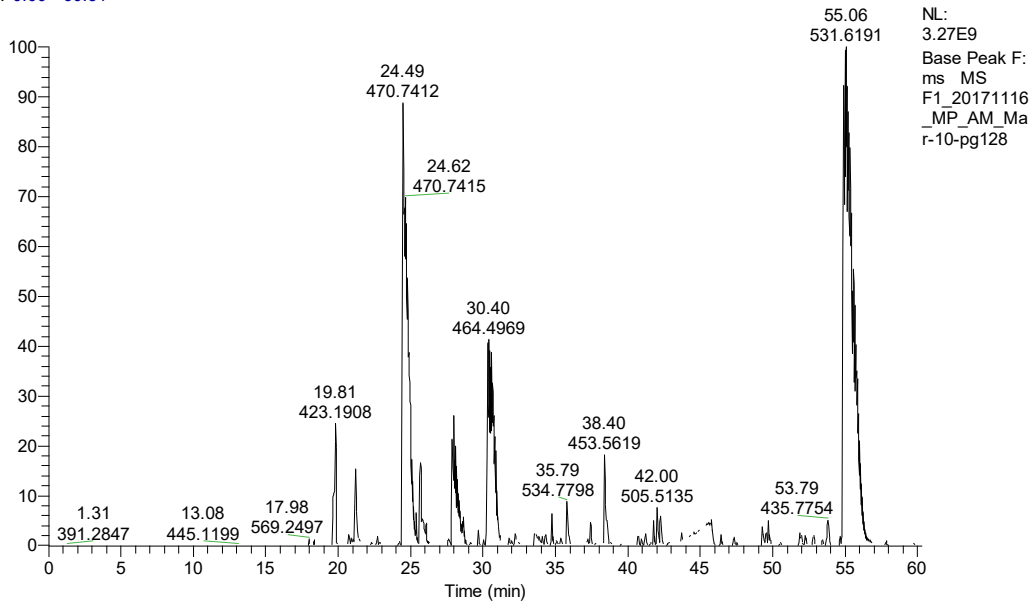


Dekonvoliertes Spektrum der LC-MS-Analyse der intakten Myoglobinmutante Myo-D127ppSBn.

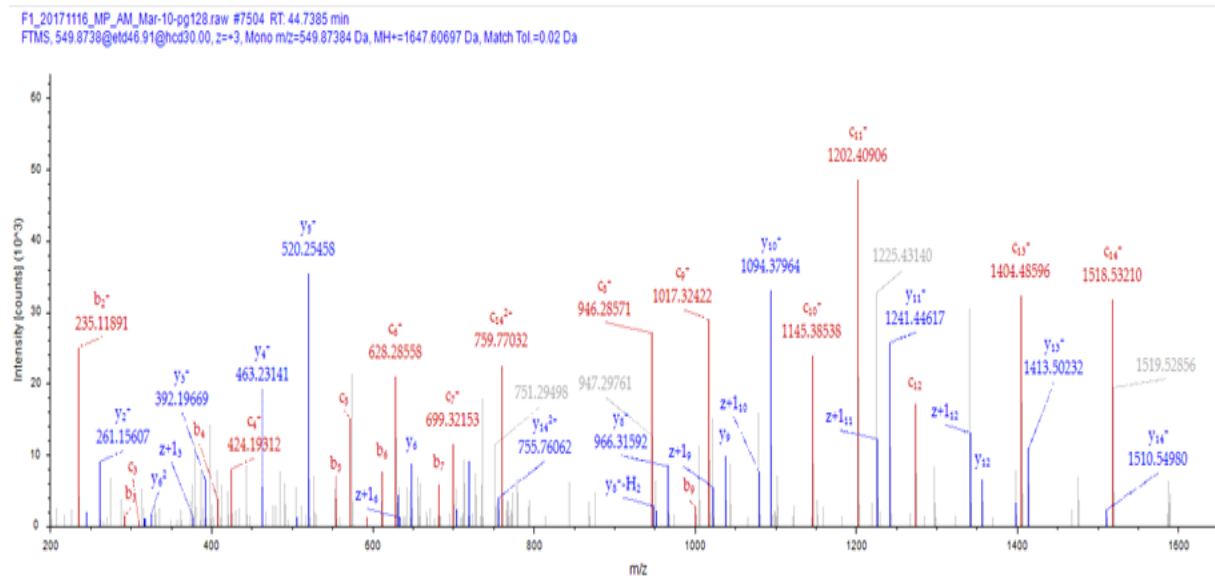
Ergebnisse des *bottom-up*-Proteomikansatzes

Totalionenstrom des *bottom-up*-Proteomikansatzes

RT: 0.00 - 60.31

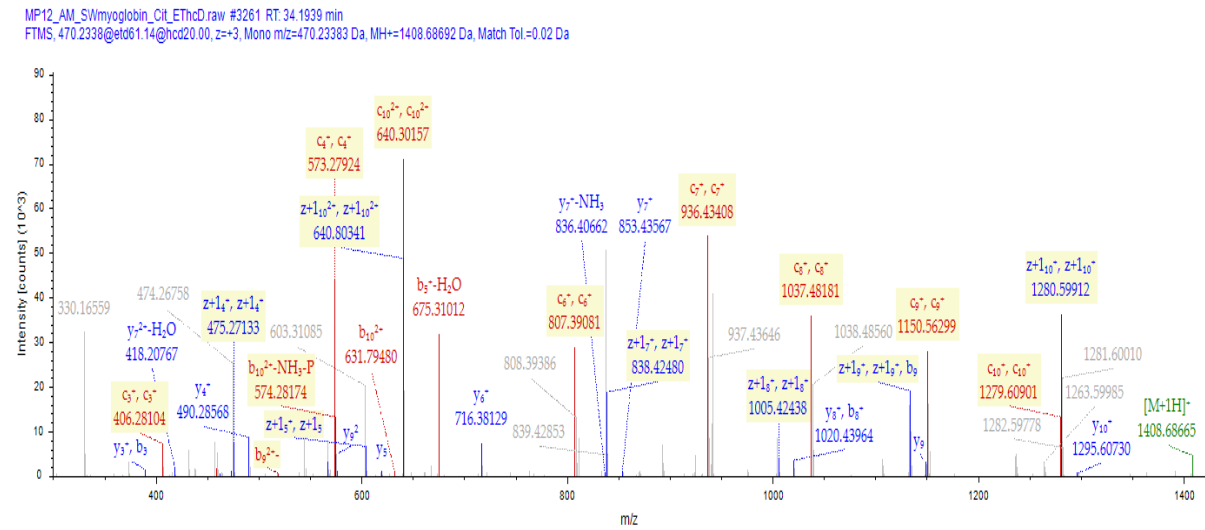


Peptide spectrum match zur Charakterisierung der Pyrophosphorylierungsstelle

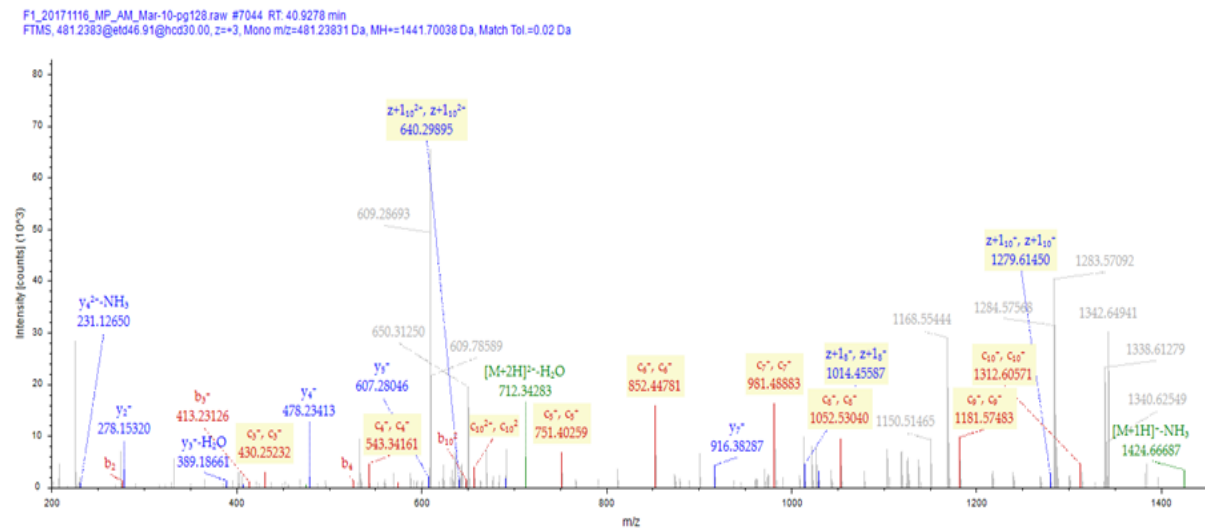


Peptide Spektrum Match des EThcD MS/MS-Spektrum des modifizierten Peptides HPGDF-GA**pp**SAQGAMNK.

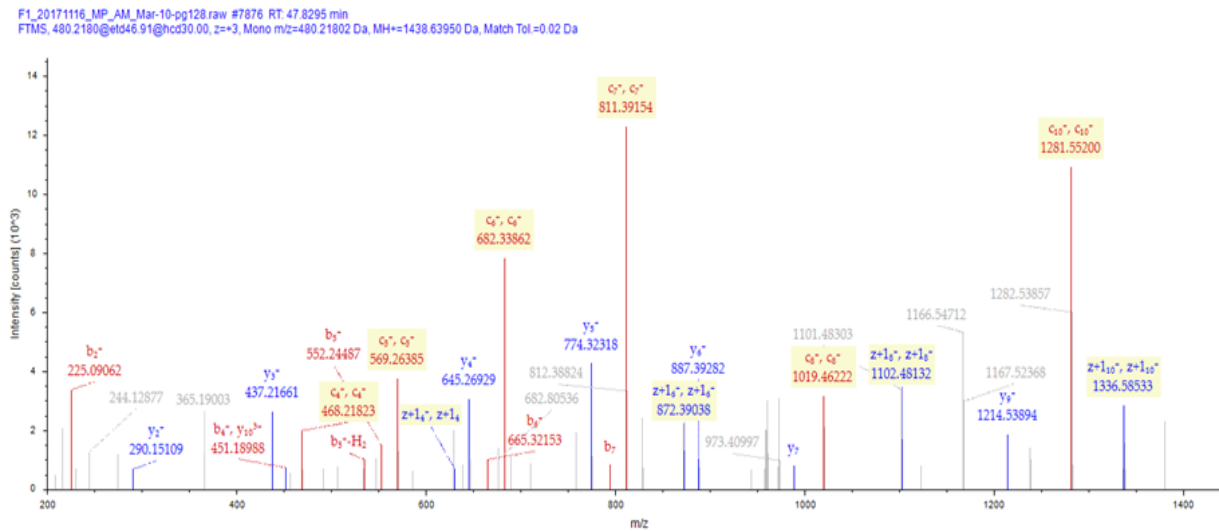
Peptid spectrum matches zur Charakterisierung von Nebenprodukten



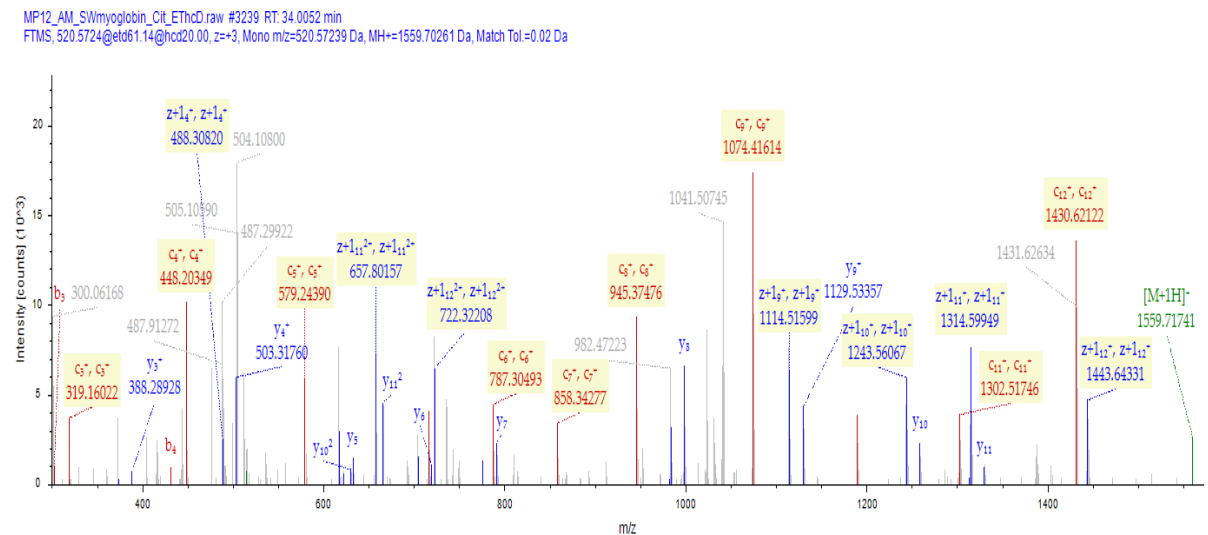
Peptide Spektrum Match des EThcD MS/MS-Spektrum des modifizierten Peptides LFpKSHPETLEK.



Peptide Spektrum Match des EThcD MS/MS-Spektrum des modifizierten Peptides FKHLpKTEA-EMK.

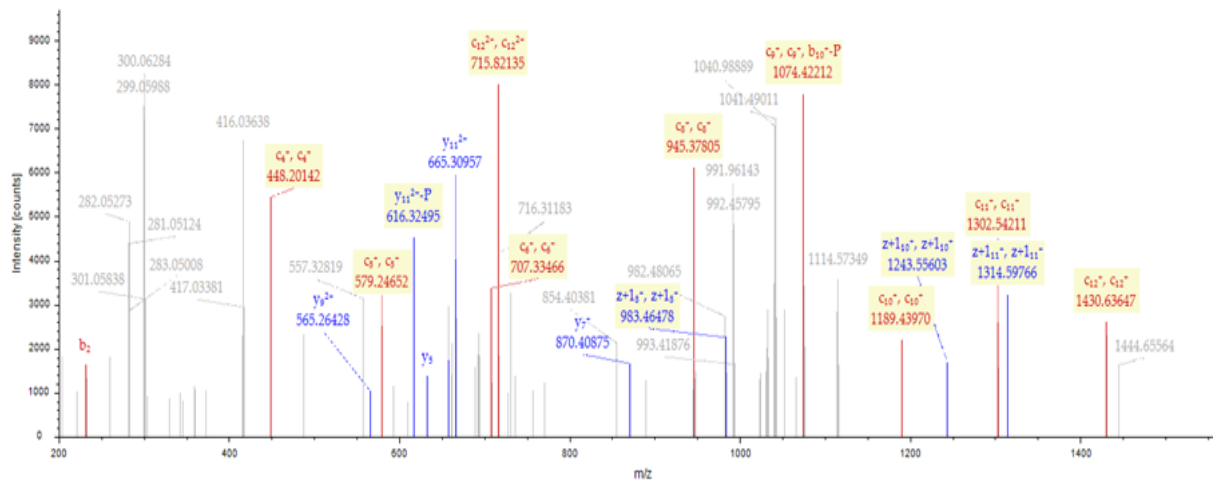


Peptide Spektrum Match des EThcD MS/MS-Spektrum des modifizierten Peptides SHPET-LEpKFDR.



Peptide Spektrum Match des EThcD MS/MS-Spektrum des modifizierten Peptides TEAEMpKASE-DLKK.

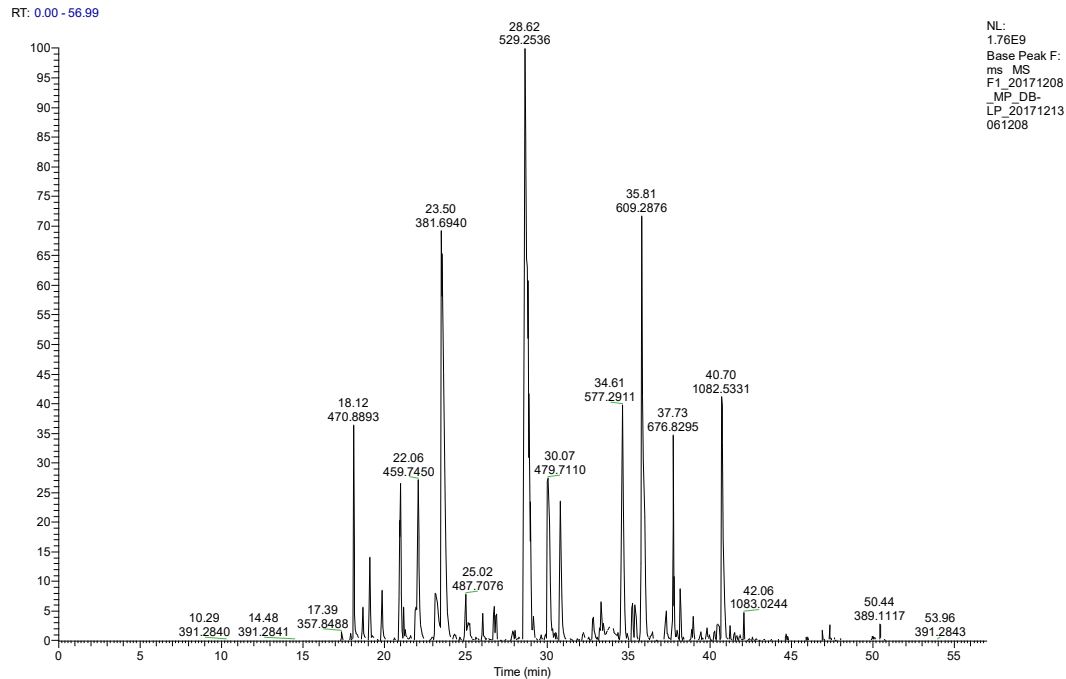
F1_20171116_MP_AM_Mar-10-pg128.raw #6294 RT: 34.8626 min
FTMS, 520.5731@etd46.91@hcd30.00, z=+3, Mono m/z=520.57312 Da, MH+=1559.70481 Da, Match Tol.=0.02 Da



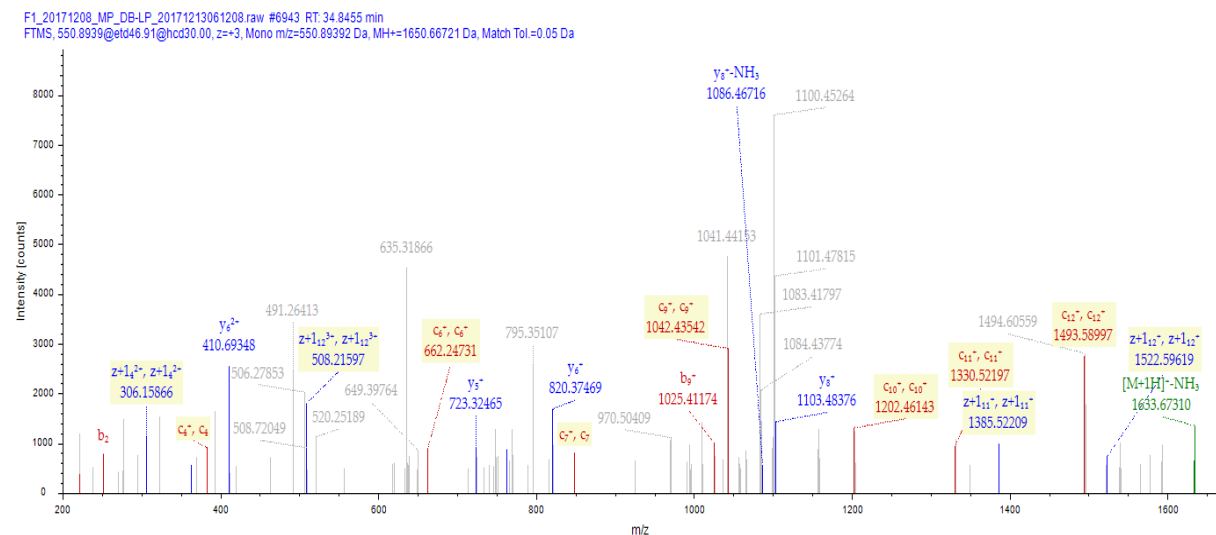
Charakterisierung der cysteinphosphorylierten Angiogenin S87C-Mutante

Ergebnisse des *bottom-up*-Proteomikansatzes

Totalionenstrom des *bottom-up*-Proteomikansatzes

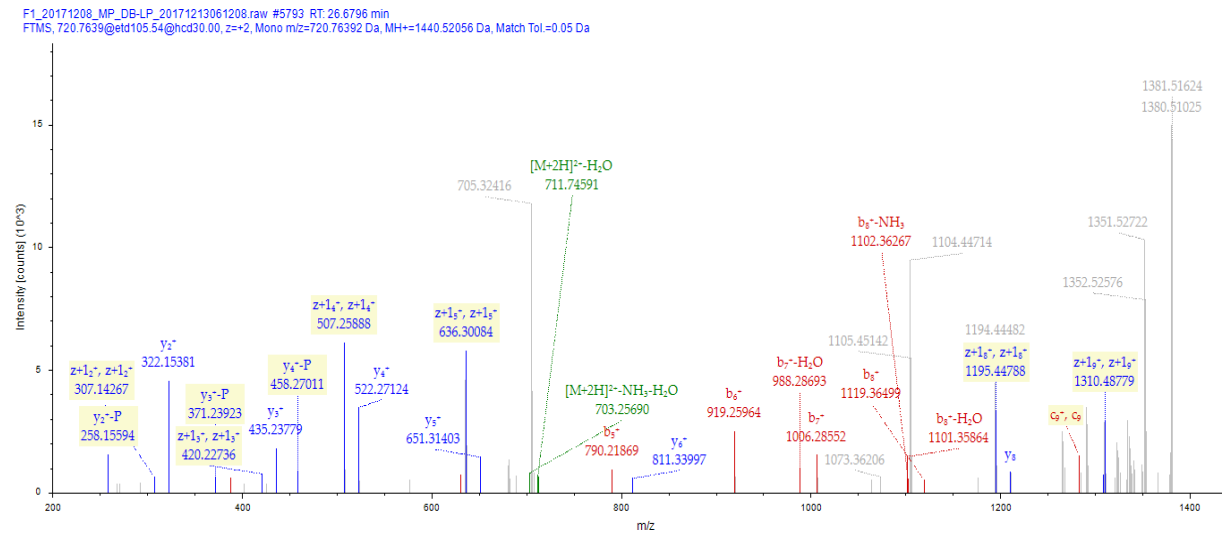


Peptide spectrum match zur Charakterisierung der Cysteinphosphorylierungsstelle



Peptide Spektrum Match des EThcD MS/MS-Spektrum des modifizierten Peptides LHGGpCPWPPcamCQYR.

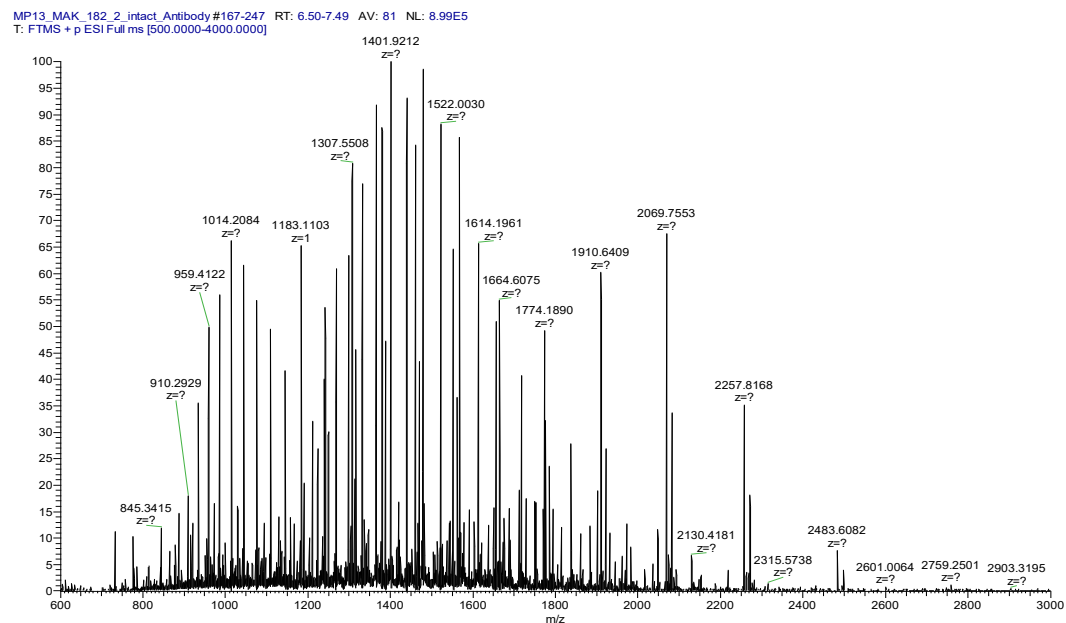
Zusätzliche Cysteinsulfatierung auf dem Protein



Peptide Spektrum Match des EThcD MS/MS-Spektrum des modifizierten Peptides DDRsYcamCESI-oxMR.

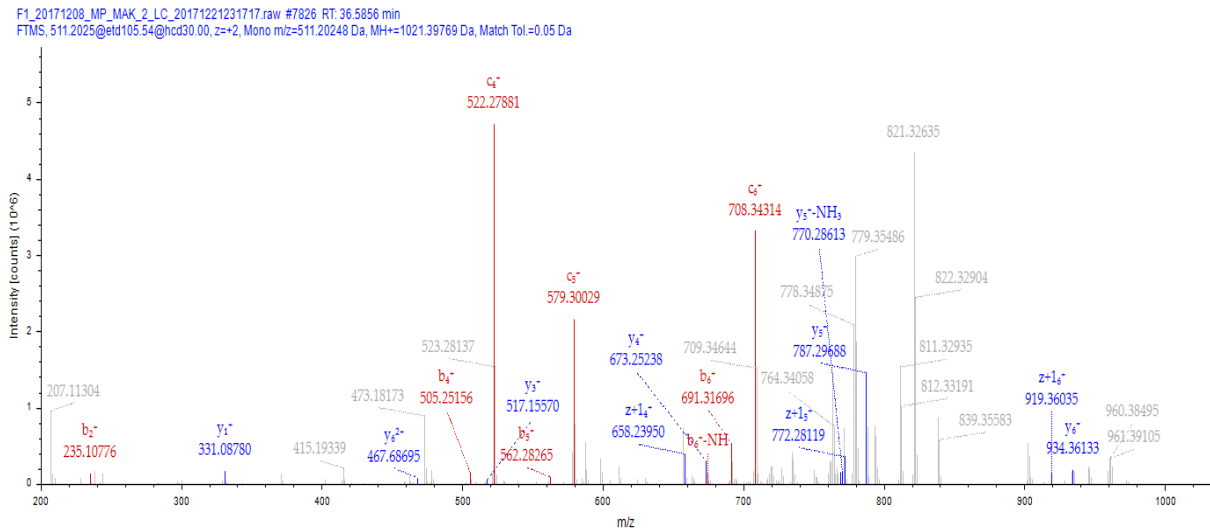
Charakterisierung von Antikörperwirkstoffkonjugaten

Ergebnisse der LC-MS-Analyse der intakten Antikörperwirkstoffkonjugatuntereinheiten



MS¹ Übersichtsspektrum der LC-MS-Analyse der Antikörperwirkstoffkonjugatuntereinheiten.

Proteindekonvolution



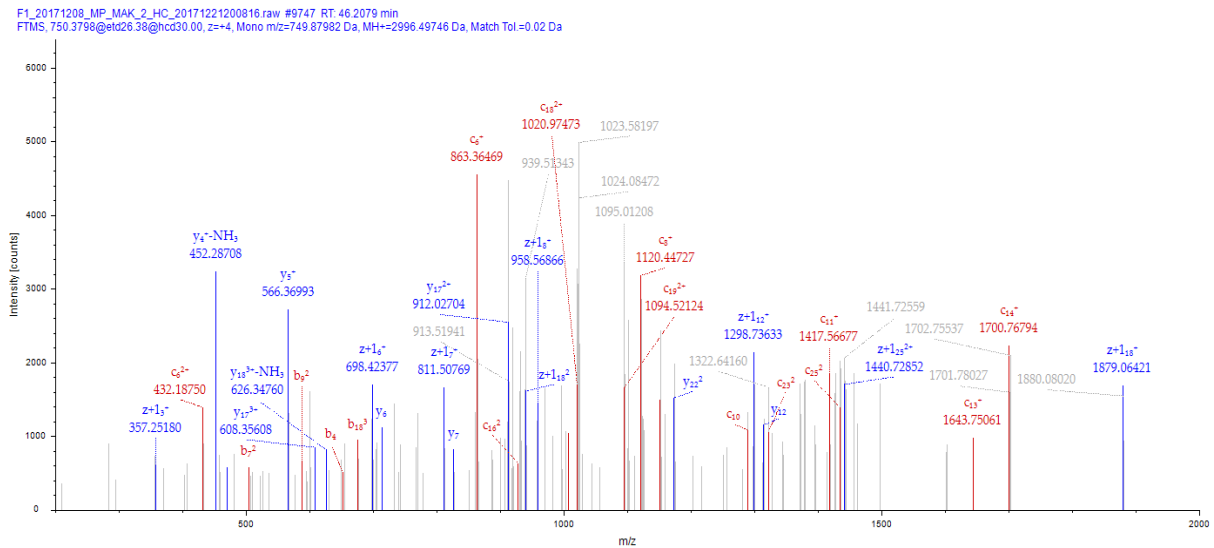
Peptide Spektrum Match des EThcD MS/MS-Spektrum des modifizierten Peptides SFNRGEp5C.

Charakterisierung der schweren Kette Trastuzumabs

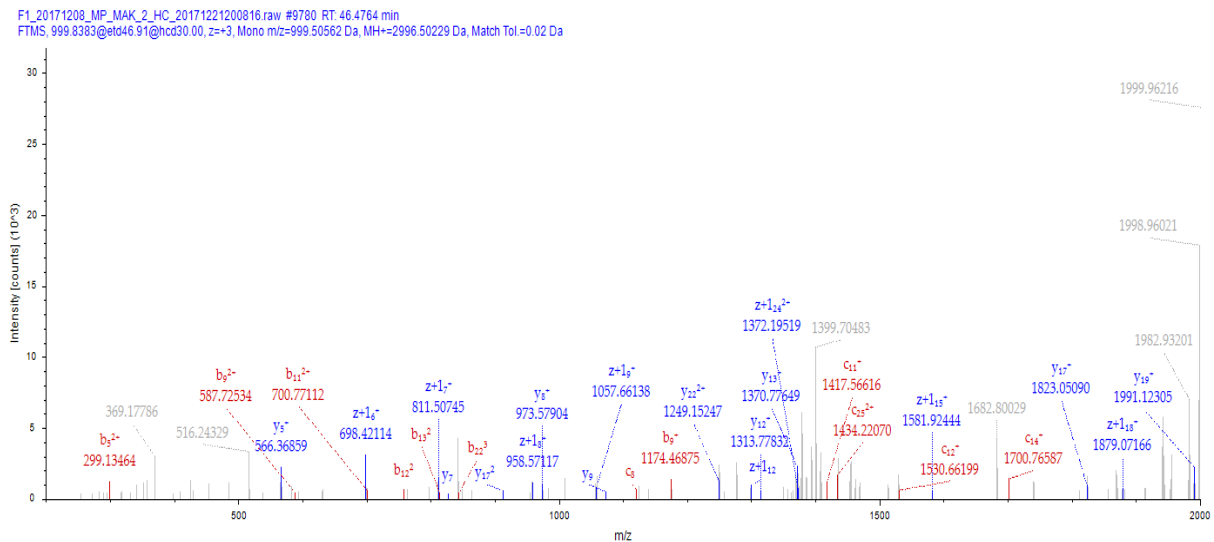
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYA-
DSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVVYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLLTVSSAST-
KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY-
SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPPKSCDKTHTCPPCPAPELL-
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK-
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTIS-
KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP-
VLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK

Sequenzabdeckung: Die grün unterlegten Sequenzabschnitte repräsentieren identifizierte Abschnitte des Proteins. Gelb markierte Methioninreste sind oxidiert. Rosa gekennzeichnete Cysteinreste sind cam-modifiziert. Die korrekte Cysteinmodifikation an Position C214 wurde Blau hervorgehoben und die relevante Peptidsequenz unterstrichen.

Peptide Spektrum Matches zur Lokalisierung der Cysteinmodifikationen auf der schweren Kette Trastuzumabs.



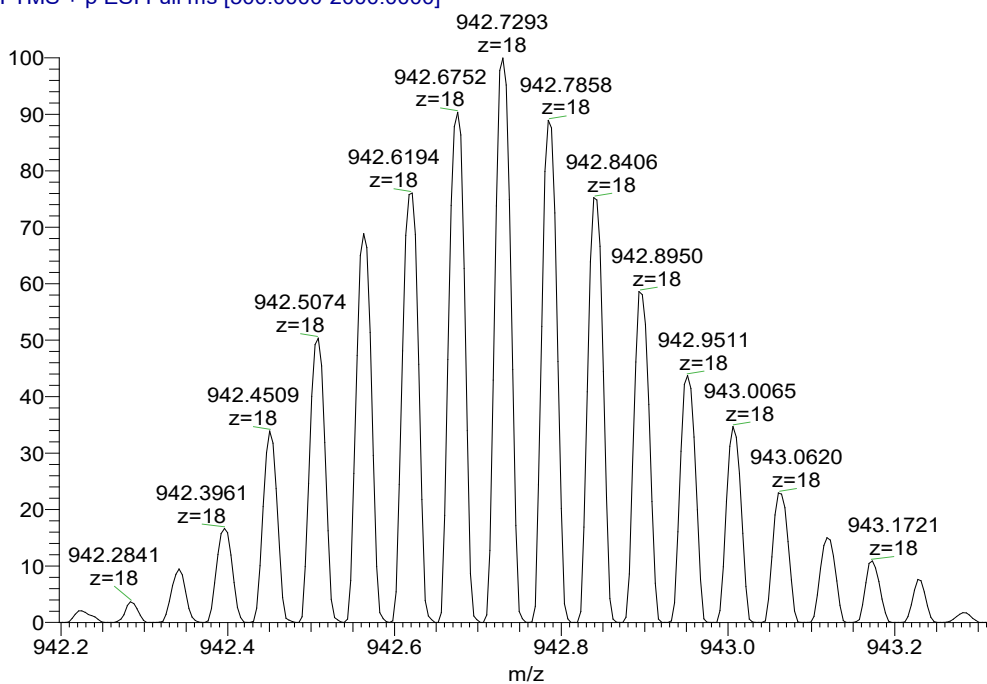
Peptide Spektrum Match des EThcD MS/MS-Spektrum des modifizierten Peptides THTp5CPPcamCPAPELLGGPSVFLFPPKPK.



Peptide Spektrum Match des EThcD MS/MS-Spektrum des modifizierten Peptides THTcamCPPp5CPAPELLGGPSVFLFPPKPK.

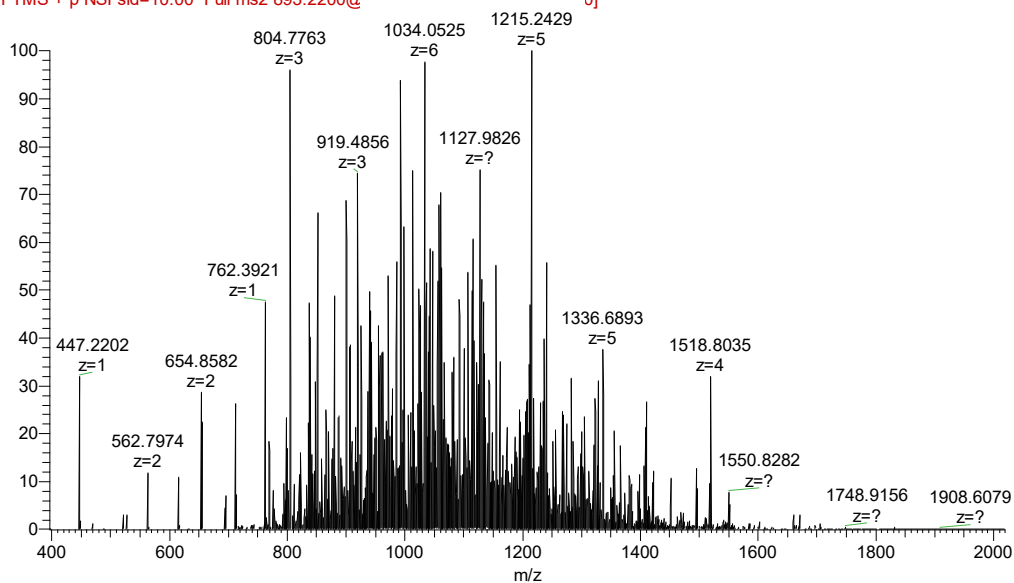
Top-down-Fragmentierung von Myoglobin

Myoglobin50FT120 #128-138 RT: 7.49-7.96 AV: 11 NL: 3.98E6
T: FTMS + p ESI Full ms [500.0000-2000.0000]

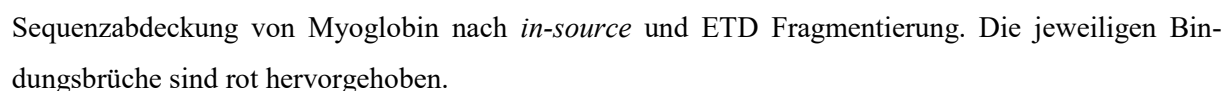
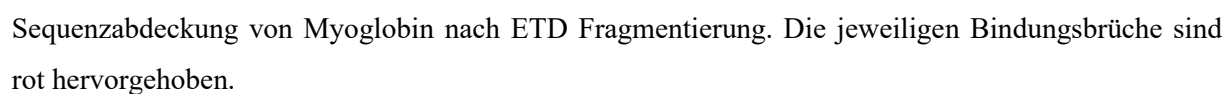


Isotopenmuster des 18-fach geladenen Precursorions bei einer Auflösung von 120.000.

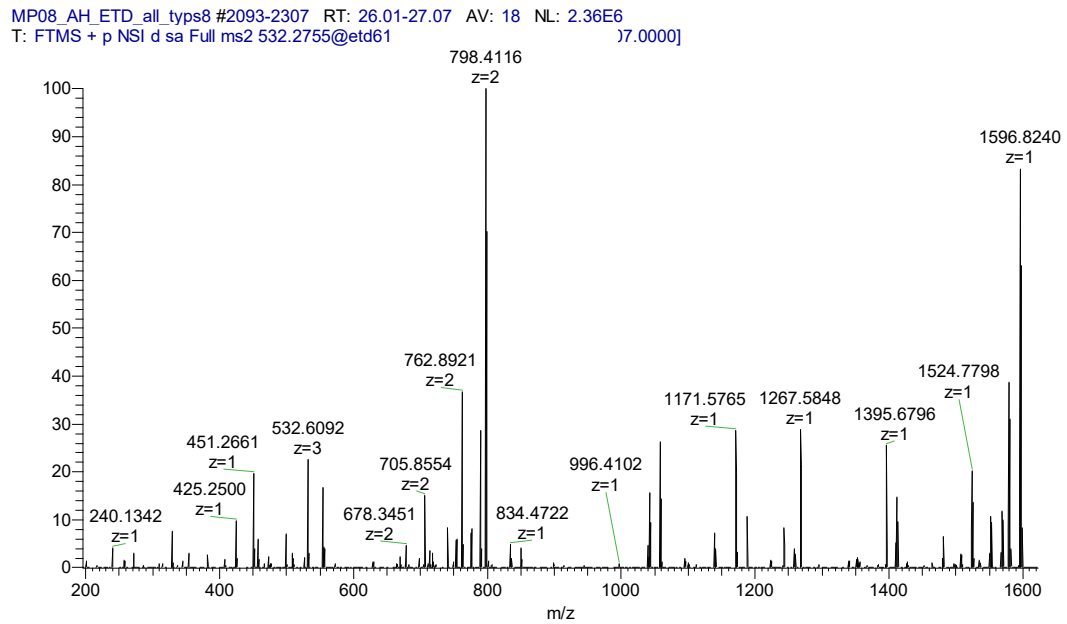
myoglobin_50pgperul_etd1 #1-178 RT: 1.96-4.59 AV: 81 NL: 6.71E4
F: FTMS + p NSI sid=10.00 Full ms2 893.2200@



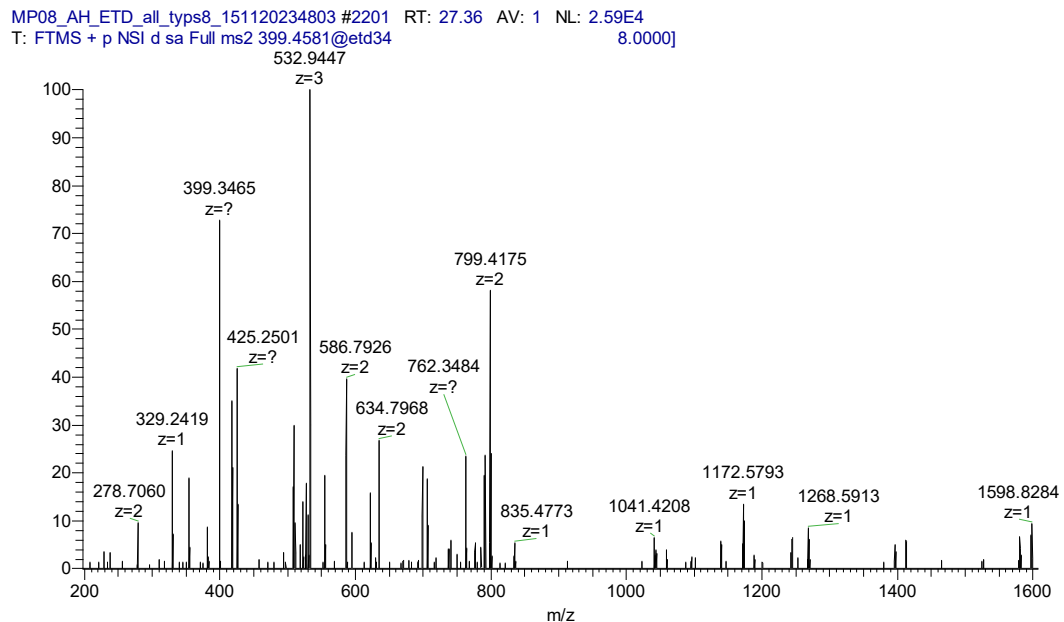
ETcD MS/MS Spektrum des 19fach geladenen Precursorions von Myoglobin.



Migration der Lysinphosphorylierung während EThcD



ETcD MS/MS Spektrum des dreifach geladenen, lysinphosphorylierten Peptides APAPAEpKpT-PVKKKA.

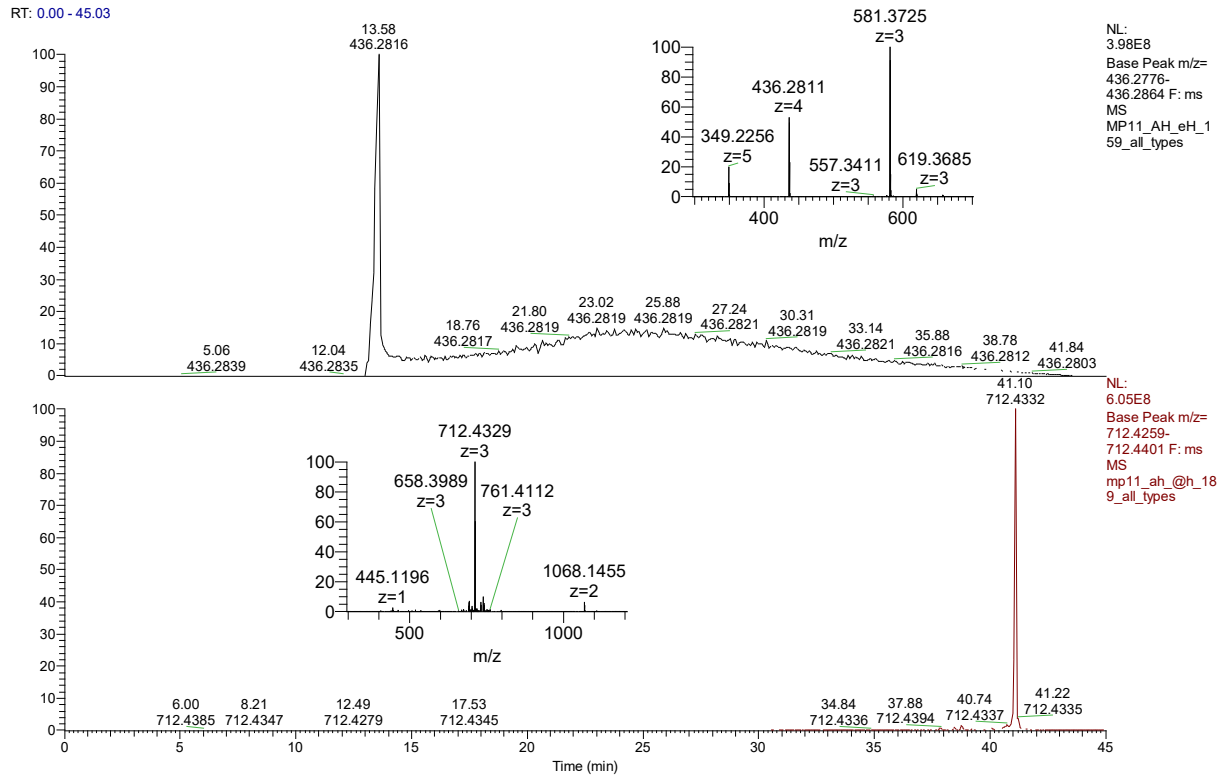


ETcD MS/MS Spektrum des vierfach geladenen, lysinphosphorylierten Peptides APAPAEpKpT-PVKKKA.

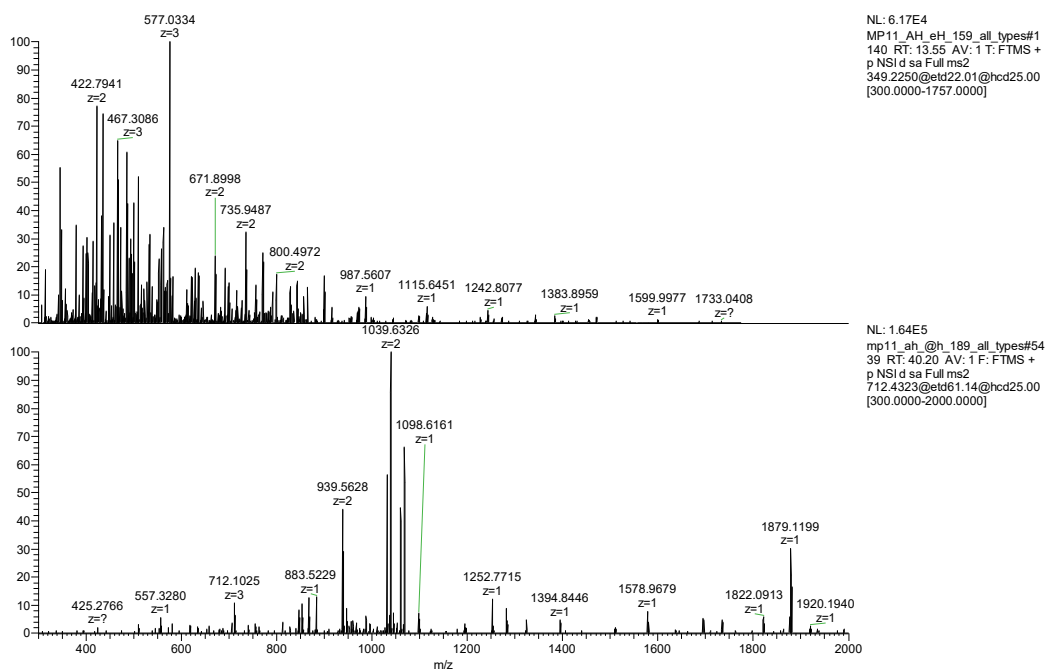
Strategien zur Identifizierung endogener Lysinphosphorylierungen

Proteomikansatz zur Identifizierung von pLy auf dem Histon H1

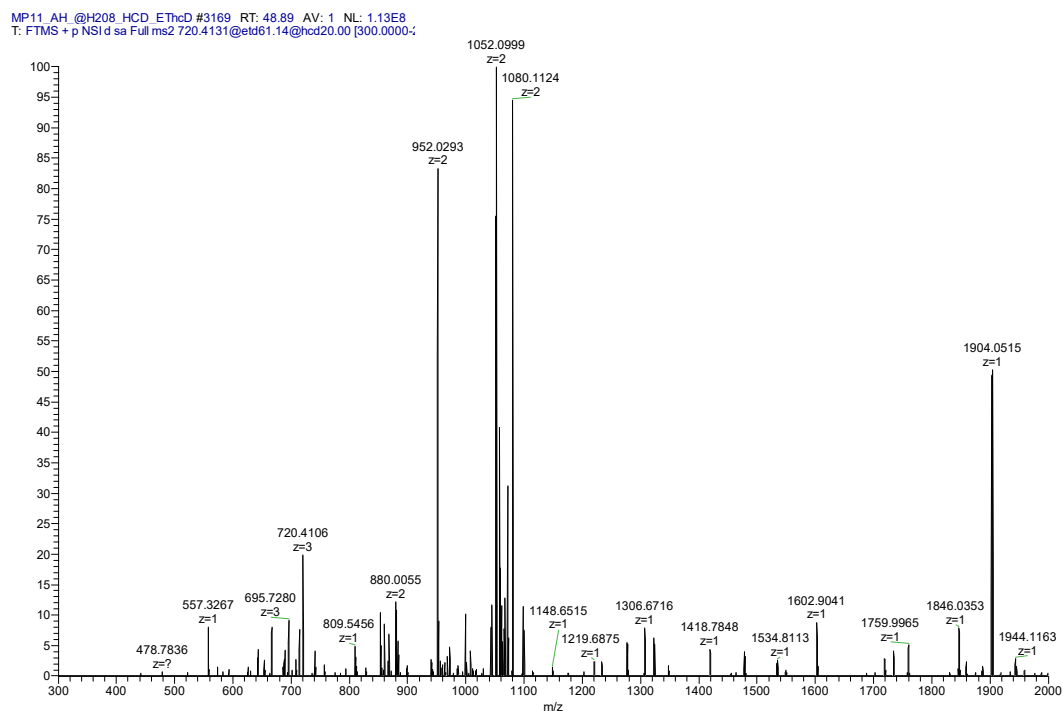
Derivatisierung von Histonmodellpeptiden



Extrahierte Ionenchromatogramme und MS¹ Spektren des Histon H1 Modellpeptides KKKARK-SAGAAKRKASG vor (obere Hälfte) und nach der Derivatisierung mit Propionsäureanhydrid (untere Hälfte).



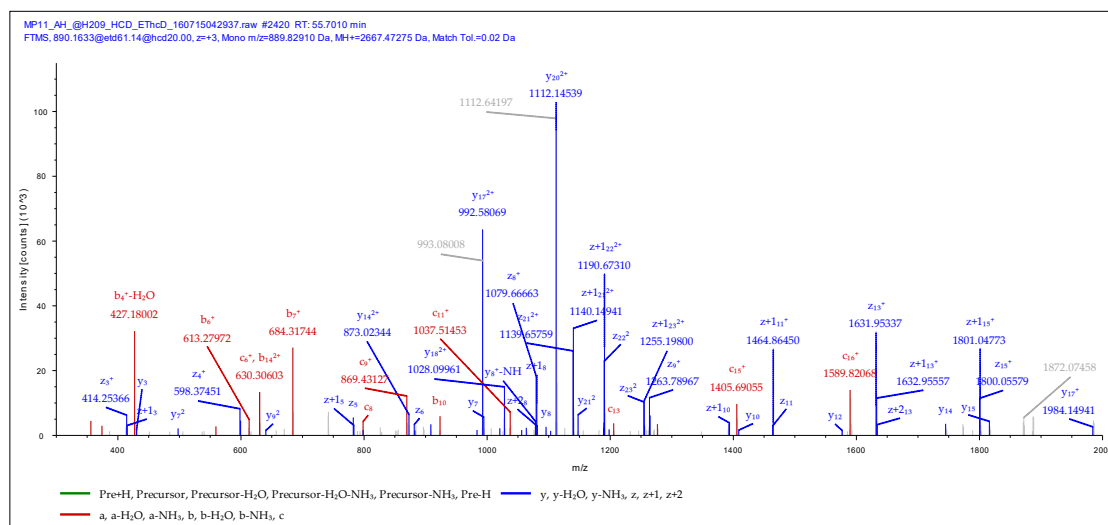
ETHcD MS/MS Spektrum des fünffach geladenen Precursorions des unmodifizierten Peptides KKKARKSAGAAKRKASG (obere Hälfte) und ETHcD MS/MS Spektrum des dreifach geladenen Precursorions des siebenfach propionylierten Peptides.



ETHcD MS/MS Spektrum des dreifach geladenen, lysinphosphorylierten und sechsfach propionylierten Peptides 2 prKprKprKARpKSAGAAprKRprKASG.

Derivatisierung von Histon H1

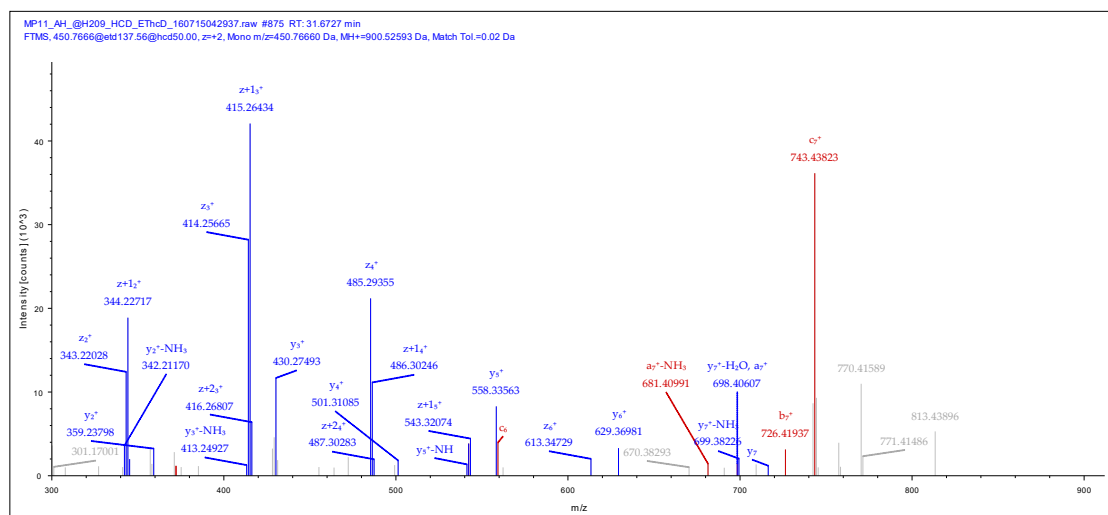
PSMs der identifizierten Peptide nach Propionylierung und tryptischen Verdau



Sequenz: SETAPAAPAPAPAEKTPVKKKAR, S1-Propionyl (56.02622 Da), K16-Propionyl (56.02622 Da), K20-Propionyl (56.02622 Da), K21-Propionyl (56.02622 Da), K22-Propionyl (56.02622 Da)

Ladung: +3, Monoisotopisch m/z : 889.82910 Da (+0.39 mmu/+0.43 ppm), MH+: 2667.47275 Da, RT: 55.7010 min,

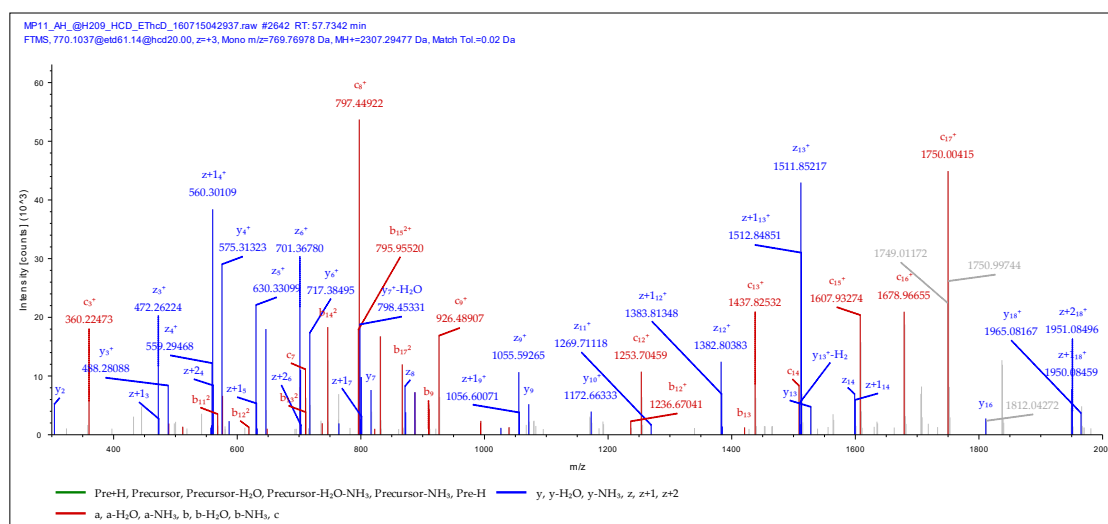
Identifiziert mit: Mascot (v1.36); Ion Score:45



Sequenz: KSAGAAKR, K1-Propionyl (56.02622 Da), K7-Propionyl (56.02622 Da)

Ladung: +2, Monoisotopisch m/z : 450.76660 Da (-0.11 mmu/-0.24 ppm), MH+: 900.52593 Da, RT: 31.6727 min,

Identifiziert mit: Mascot (v1.36); Ion Score:39



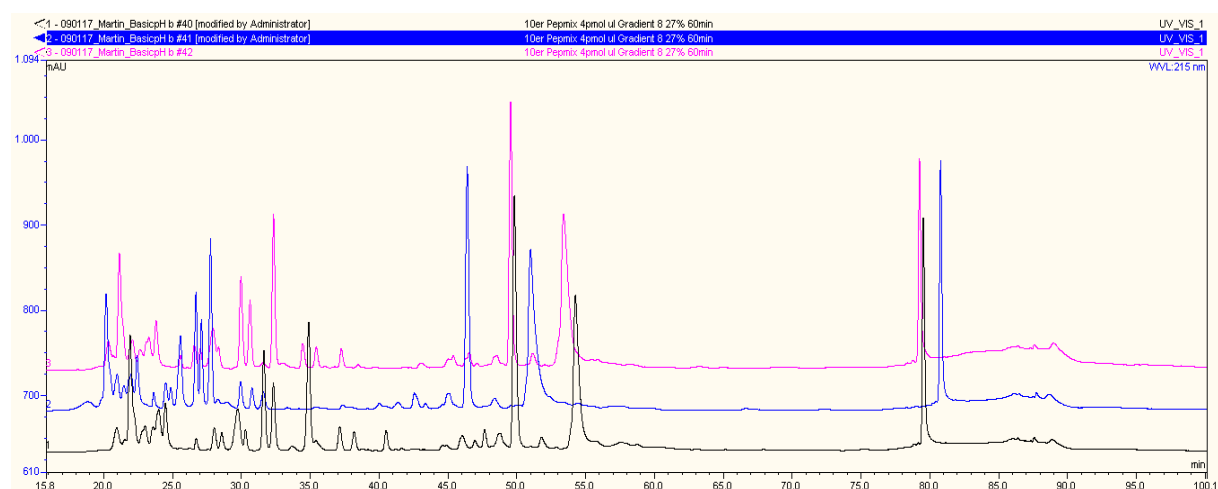
Sequenz: KASGPPVSELITKAVAASKER, K1-Propionyl (56.02622 Da), K13-Propionyl (56.02622 Da), K19-Propionyl (56.02622 Da)

Ladung: +3, Monoisotopisch m/z : 769.76978 Da (+0.98 mmu/+1.27 ppm), MH+: 2307.29477 Da, RT: 57.7342 min,

Identifiziert mit: Mascot (v1.36); Ions Score:54

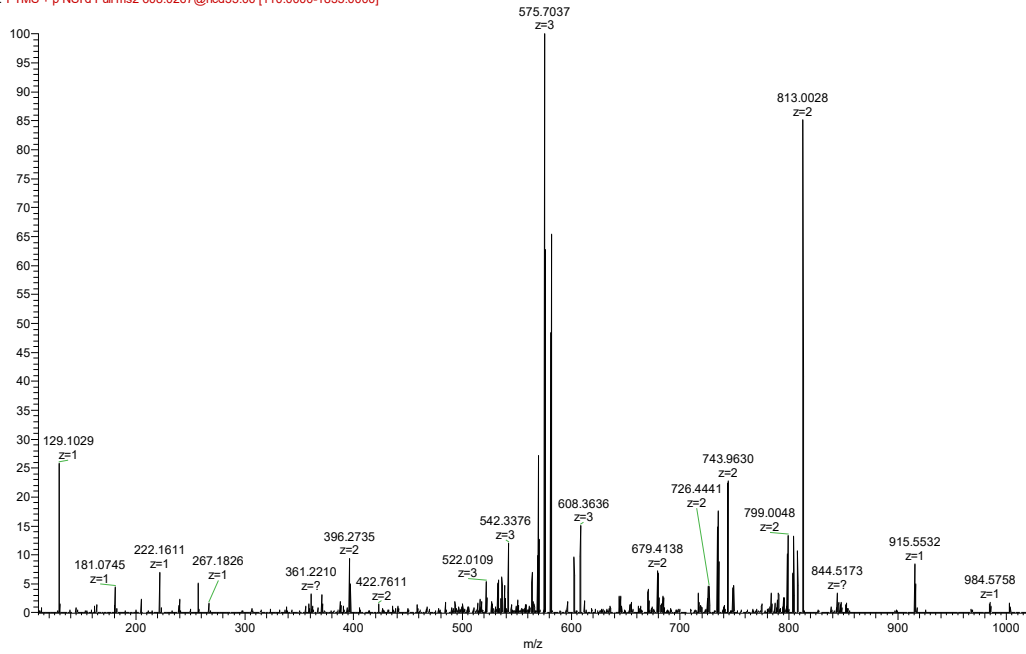
Proteomweite Identifizierung labiler Phosphorylierungen mit dem Fokus auf pLys

Basische RP-Chromatographie zur Fraktionierung von komplexen Peptidgemischen



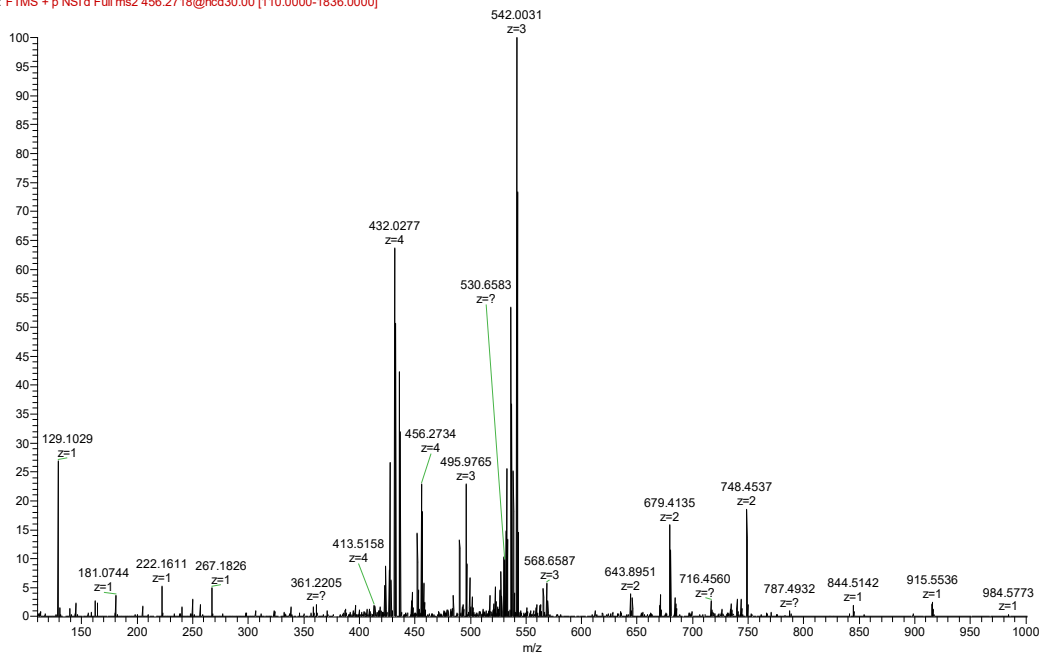
Wiederholte Injektion des BSA-Hydrolysats zur Beurteilung der Reproduzierbarkeit der chromatographischen Trennung mit dem Gradient 1.

F1_20180412_MP_pLys_HCD #2285 RT: 16.24 AV: 1 NL: 9.22E5
F: FTMS + p NSI d Full ms2 608.0267@hcd35.00 [110.0000-1835.0000]

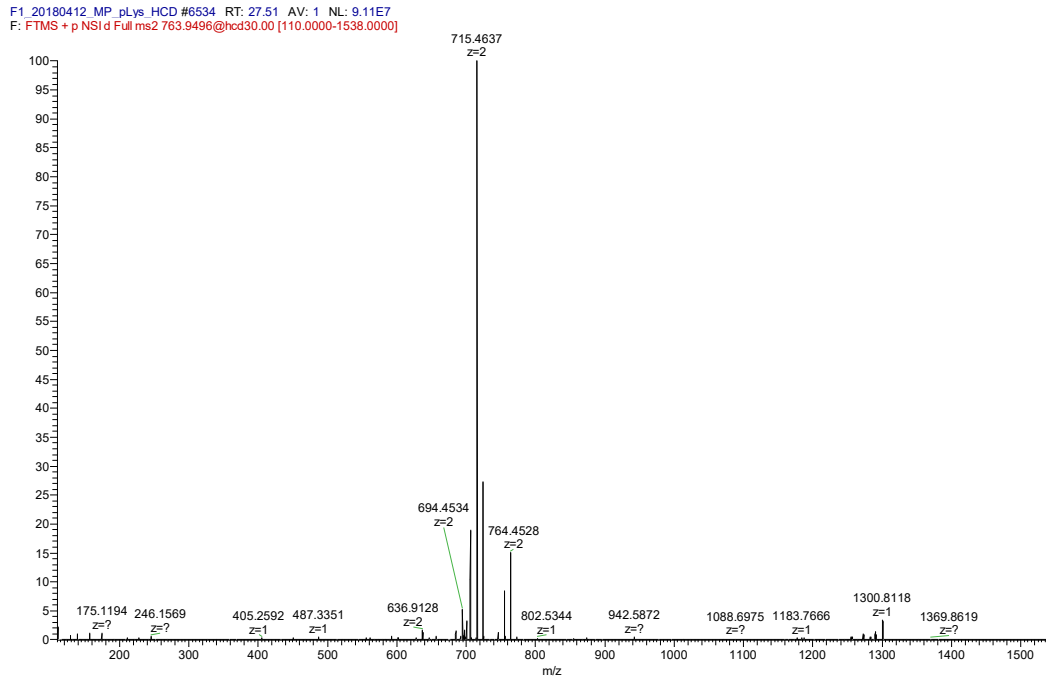


HCD MS/MS Spektrum des dreifach geladenen, lysinphosphorylierten Peptides KKKARpK-SAGAAKRKASG.

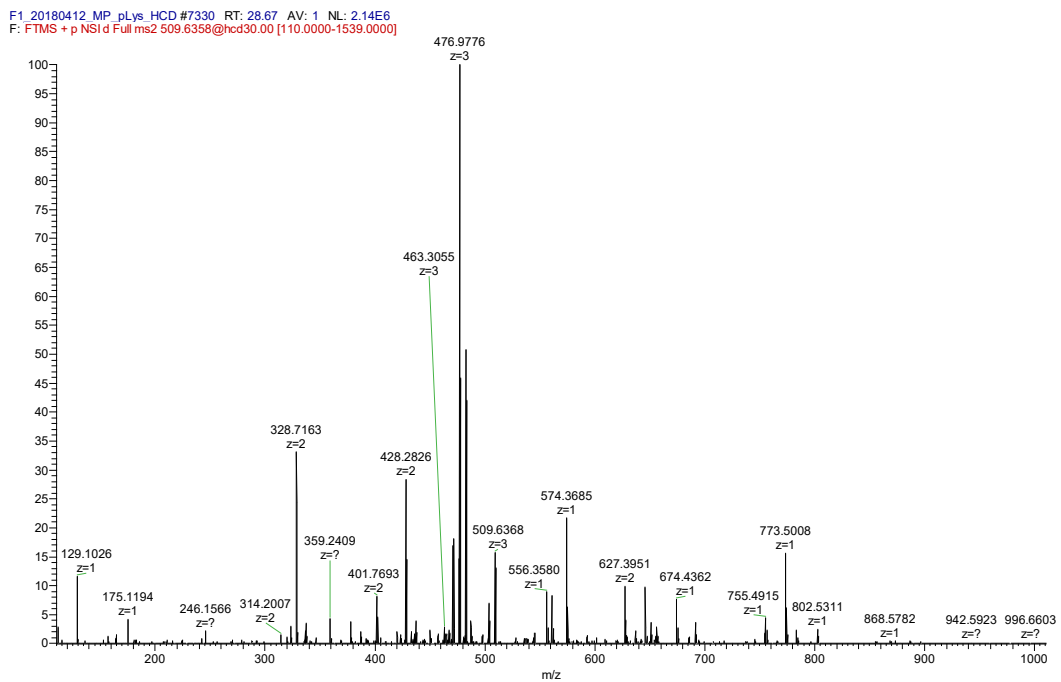
F1_20180412_MP_pLys_HCD #2287 RT: 16.25 AV: 1 NL: 3.39E5
F: FTMS + p NSI d Full ms2 456.2718@hcd30.00 [110.0000-1836.0000]



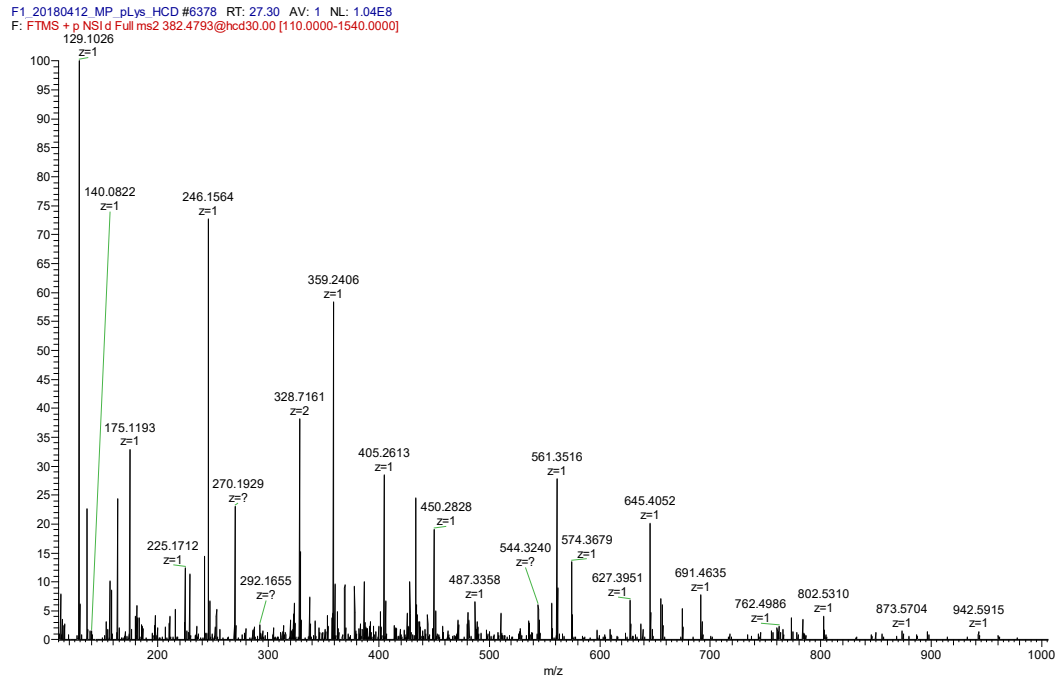
HCD MS/MS Spektrum des vierfach geladenen, lysinphosphorylierten Peptides KKKARpK-SAGAAKRKASG.



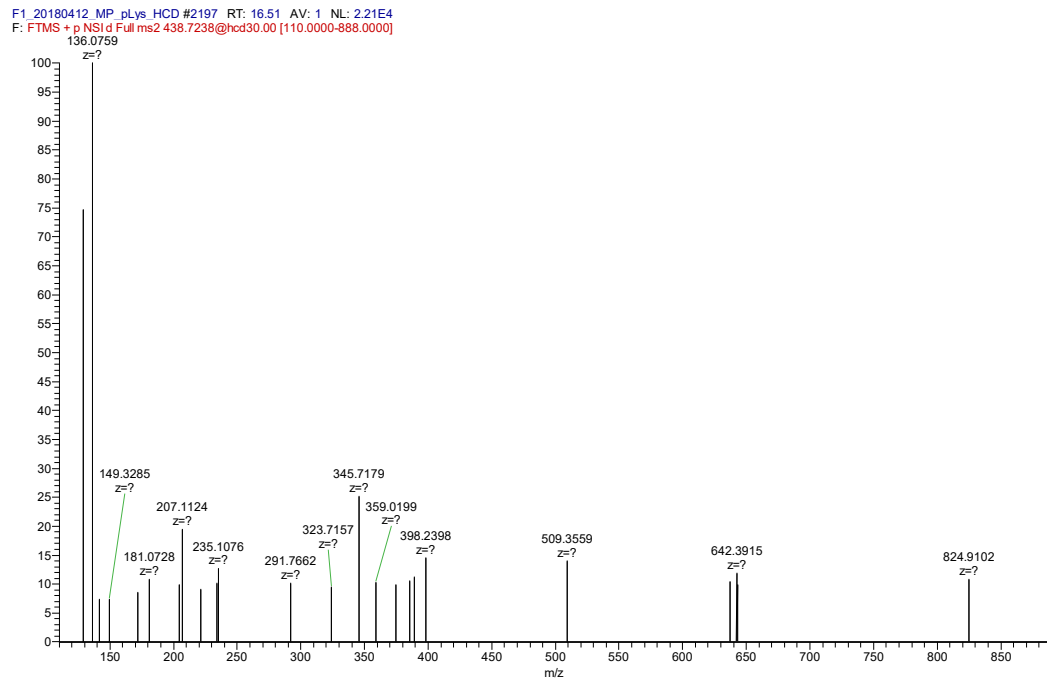
HCD MS/MS Spektrum des doppelt geladenen, lysinphosphorylierten Peptides RLYKLpKASKLAR.



HCD MS/MS Spektrum des dreifach geladenen, lysinphosphorylierten Peptides RLYKLpKASKLAR.



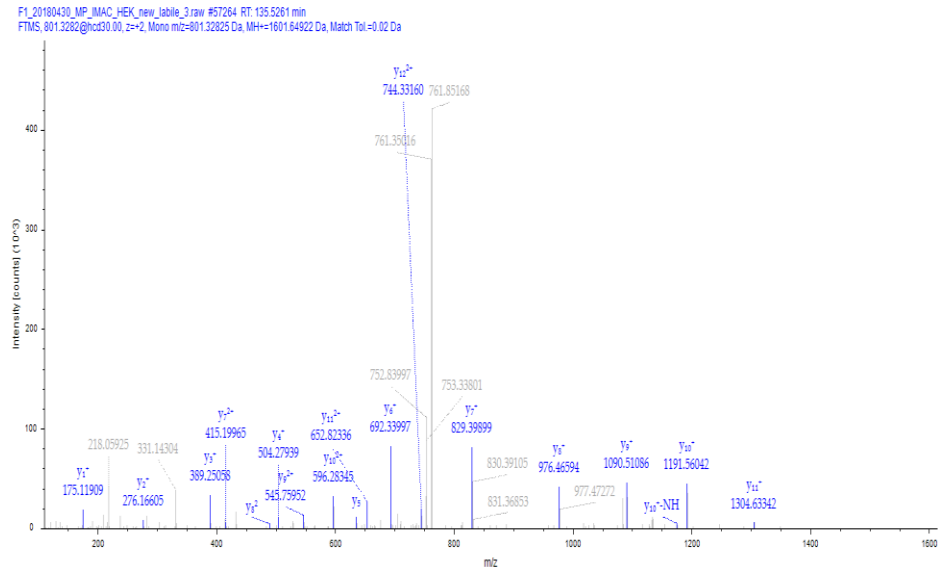
HCD MS/MS Spektrum des vierfach geladenen, lysinphosphorylierten Peptides RLYKLpKASKLAR.



HCD MS/MS Spektrum des doppelt geladenen, lysinphosphorylierten Peptides YApKKAKS.

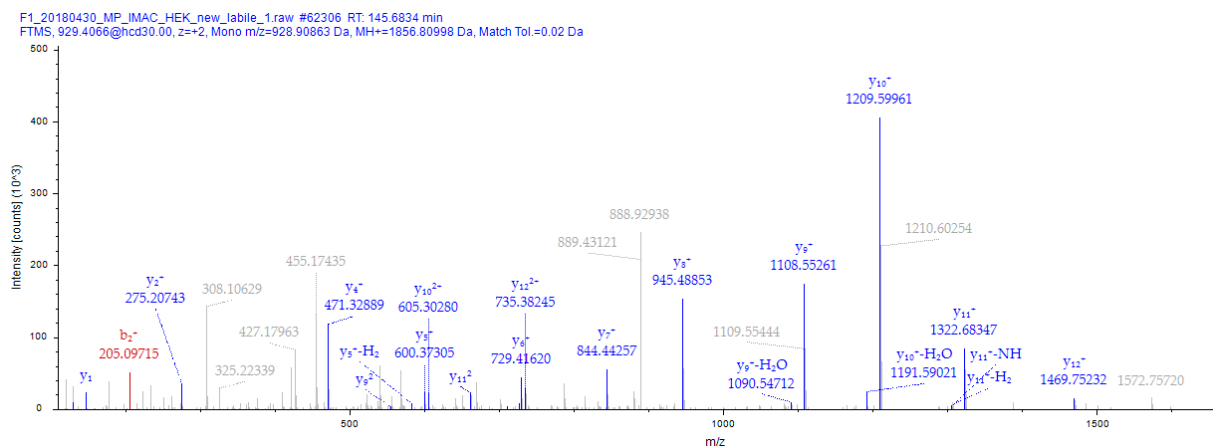
Identifizierte labile Phosphorylierungen in HEK293-Zellen

Cystein-Sulfatierung des 40s ribosomalen Proteins S3a (RPS3A) an Position C96



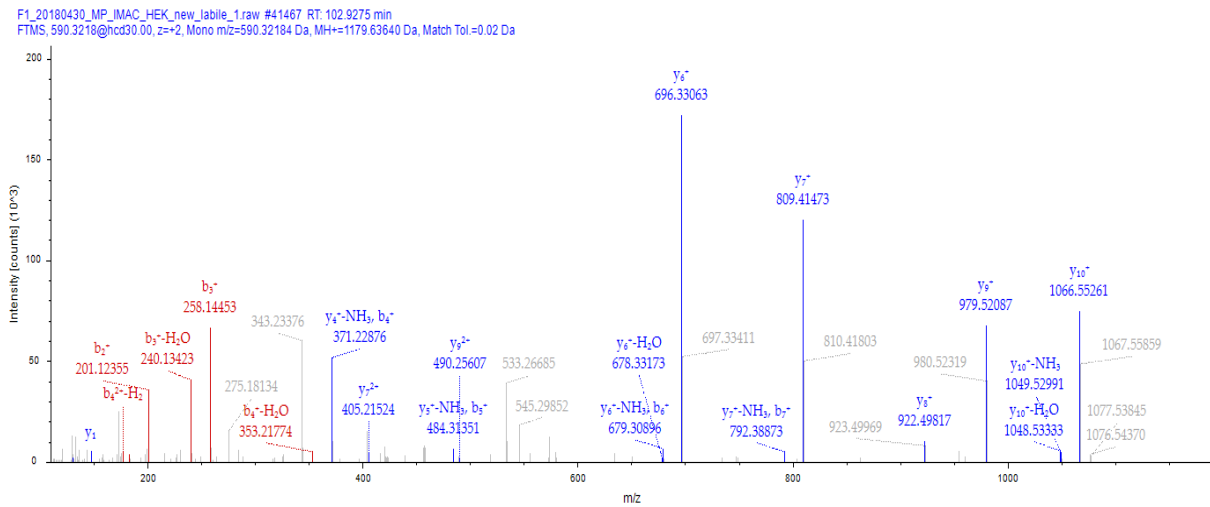
Peptide-Spektrum-Match des HCD MS/MS Spektrums des cysteinsulfatierten Peptides NsCLTNFHGMDLTR.

Cystein-Sulfatierung des Nuclearribonucleoprotein (HNRNPD) an Position C226



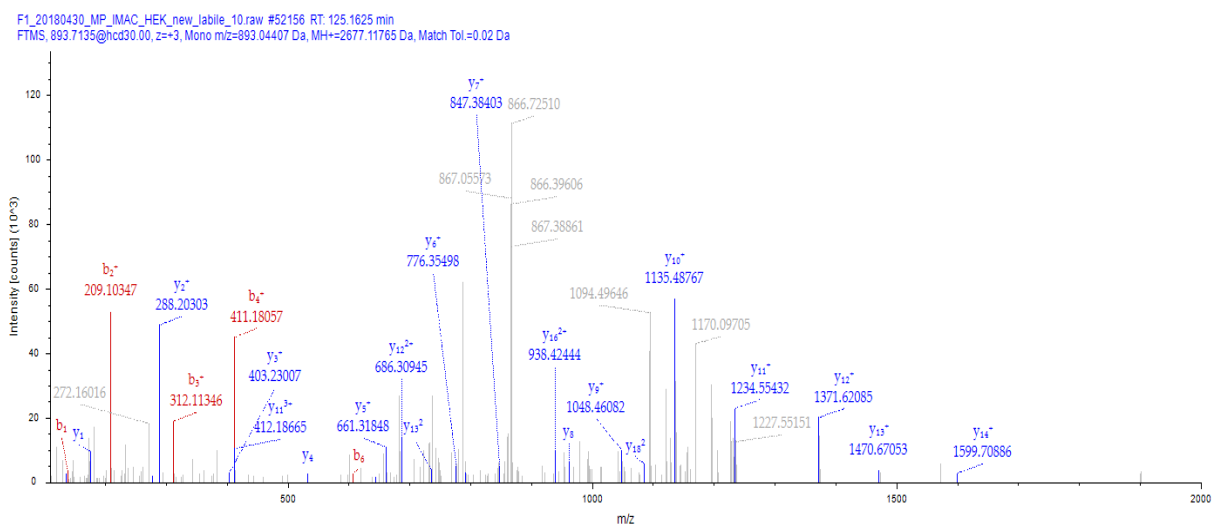
Peptide-Spektrum-Match des HCD MS/MS Spektrums des cysteinsulfatierten Peptides GFpCFITYTDEEPVKK.

Aspartatphosphorylierung der Amylase-alpha 1 (AMY1A) an Position D182



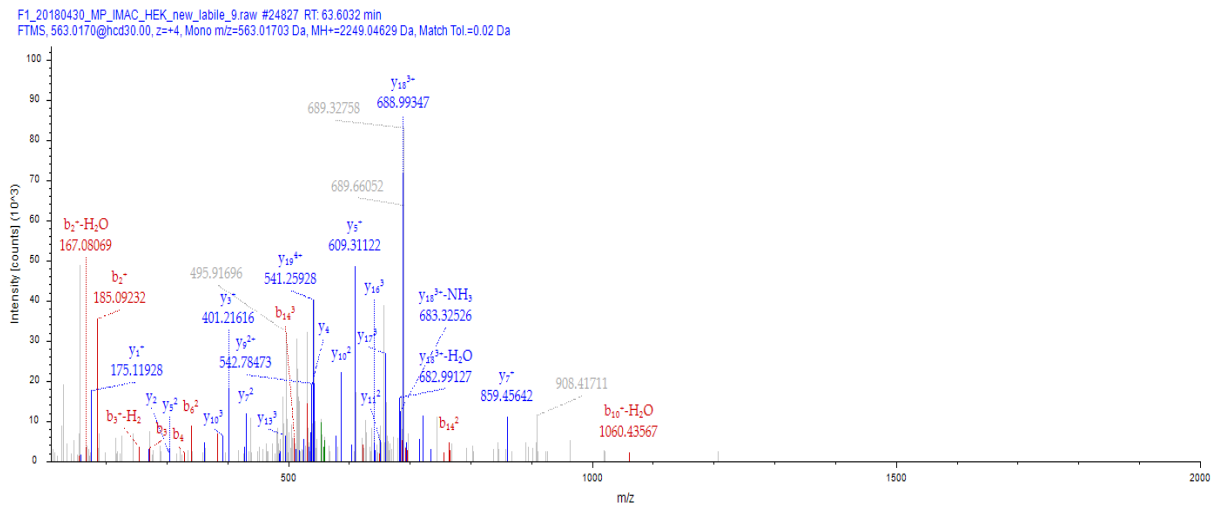
Peptide-Spektrum-Match des HCD MS/MS Spektrums des aspartatphosphorylierten Peptides
LSGLLPDLALGK.

Aspartatphosphorylierung der Isozitratdehydrogenase [NAD] Untereinheit Gamma (IDH3G) an Position D85.



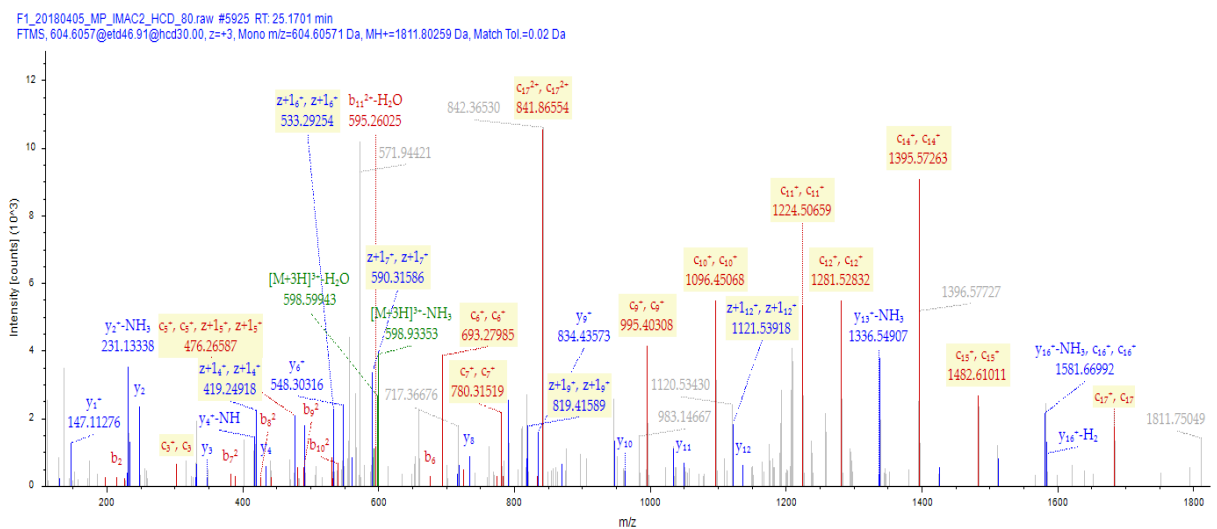
Peptide-Spektrum-Match des HCD MS/MS Spektrums des aspartatphosphorylierten Peptides
HACVPVpDFEEVHVSSNADEEDIR.

Argininphosphorylierung des Zinkfinger FYVE Domäne-enthaltenden Proteins 26 (ZFYVE26) an Position R314



Peptide-Spektrum-Match des HCD MS/MS Spektrums des argininphosphorylierten Peptides SPSGLpRSPESPQHIAHPER.

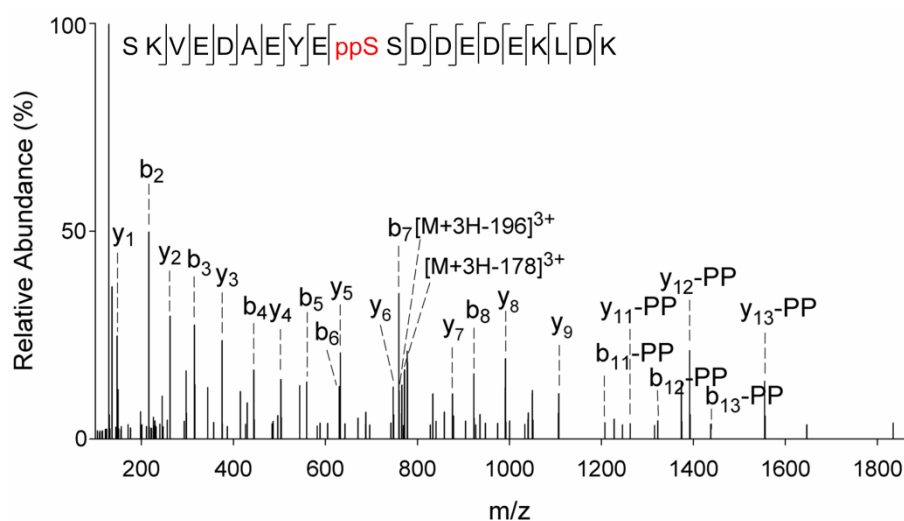
Histidinphosphorylierung des Premalins-A/C an Position H405



Peptide-Spektrum-Match des HCD MS/MS Spektrums des histidinphosphorylierten Peptides GRASSHSSQTQGGGSVTK.

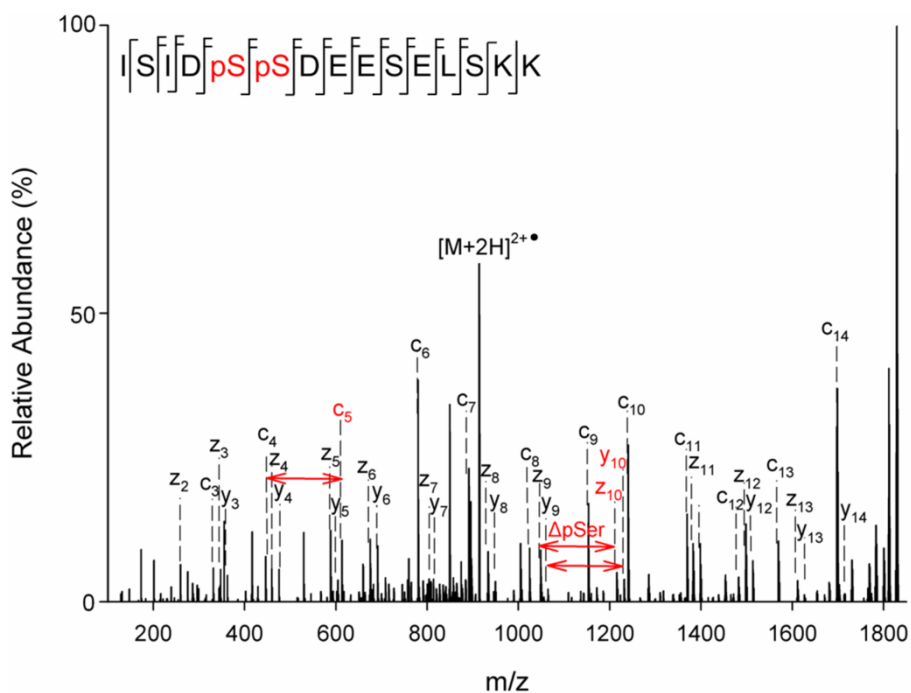
LC-MS-Analyse pyrophosphorylierter Peptide

Repräsentatives HCD MS/MS Spektrum

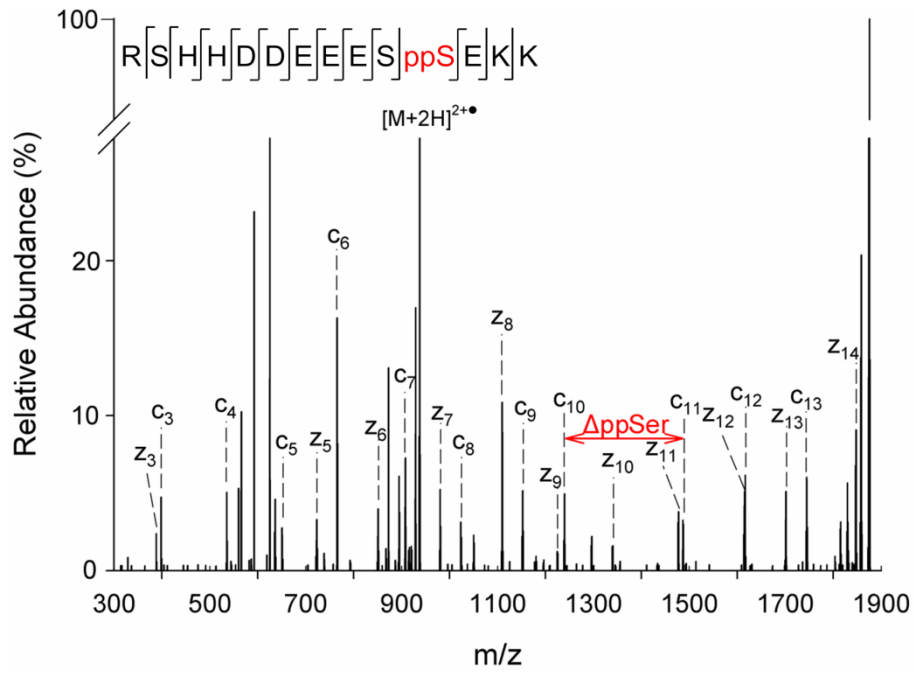


HCD MS/MS Spektrum, Sequenzabdeckung und Fragmentionenzuordnung des dreifach geladenen Peptides SKVEDAEYEppSSDDEDEKLDK (**PP-6**).

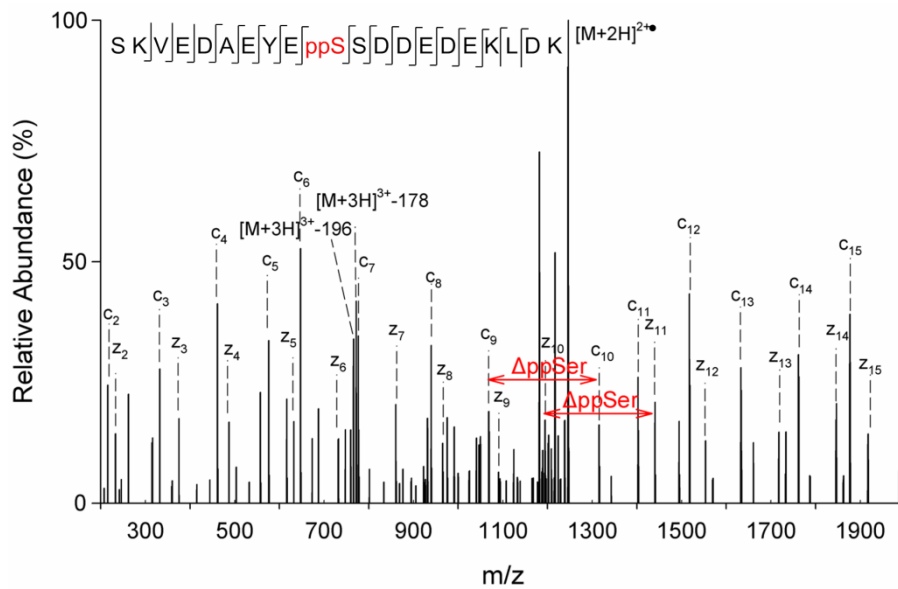
Repräsentative EThcD MS/MS Spektren von dreifach geladenen Precursorionen



EThcD MS/MS Spektrum, Sequenzabdeckung und Fragmentionenzuordnung des dreifach geladenen Peptides ISIDpSpSDEESEL SKK (**P₂-4**).

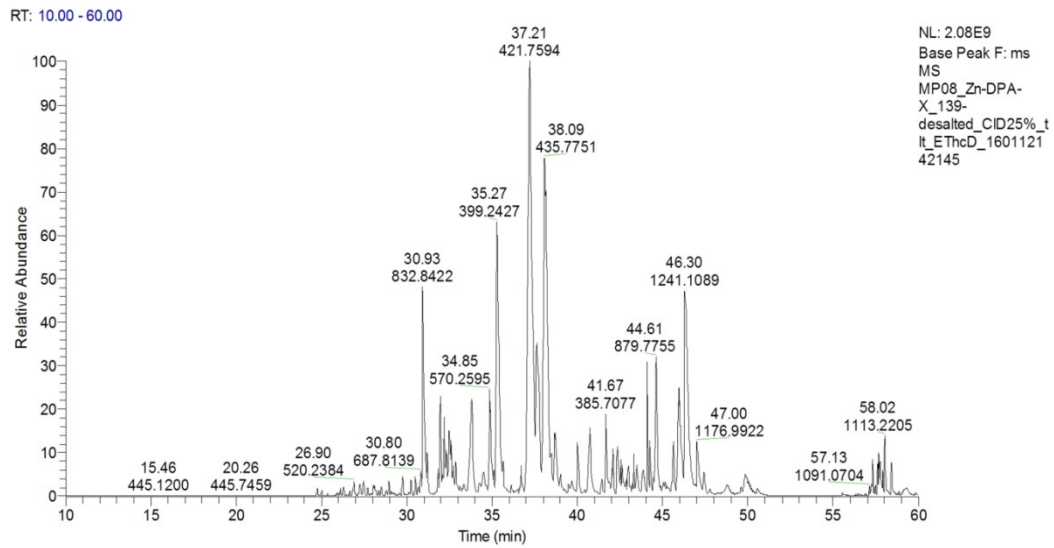


ETcD MS/MS Spektrum, Sequenzabdeckung und Fragmentionenzuordnung des dreifach geladenen Peptides RSHHDDEEESppSEKK (**PP-5**).

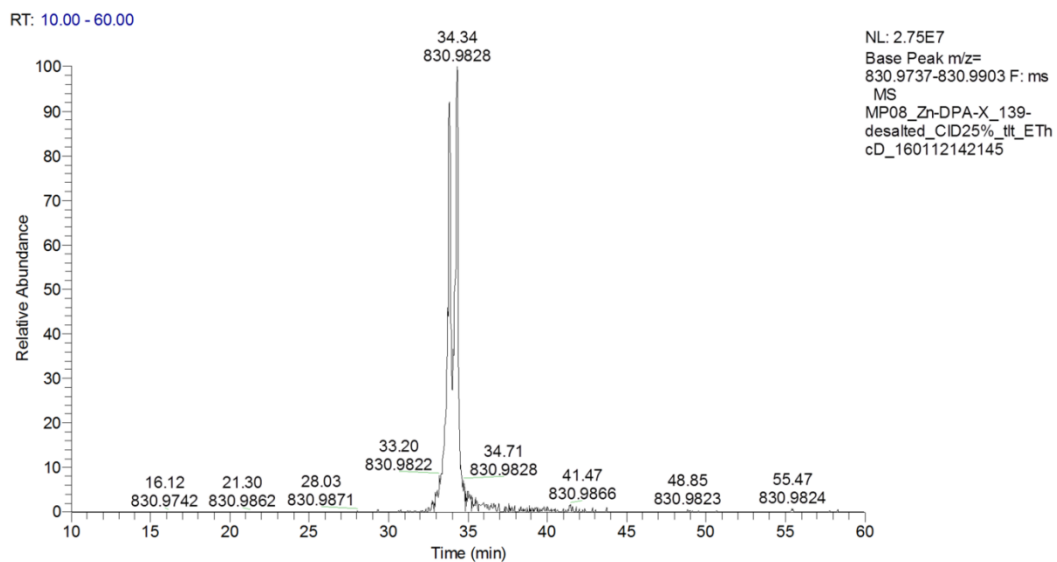


ETcD MS/MS Spektrum, Sequenzabdeckung und Fragmentionenzuordnung des dreifach geladenen Peptides SKVEDAEYEppSSDDEDEKLDK (**PP-6**).

Charakterisierung endogener Proteinpyrophosphorylierungen in *S. cerevisiae*

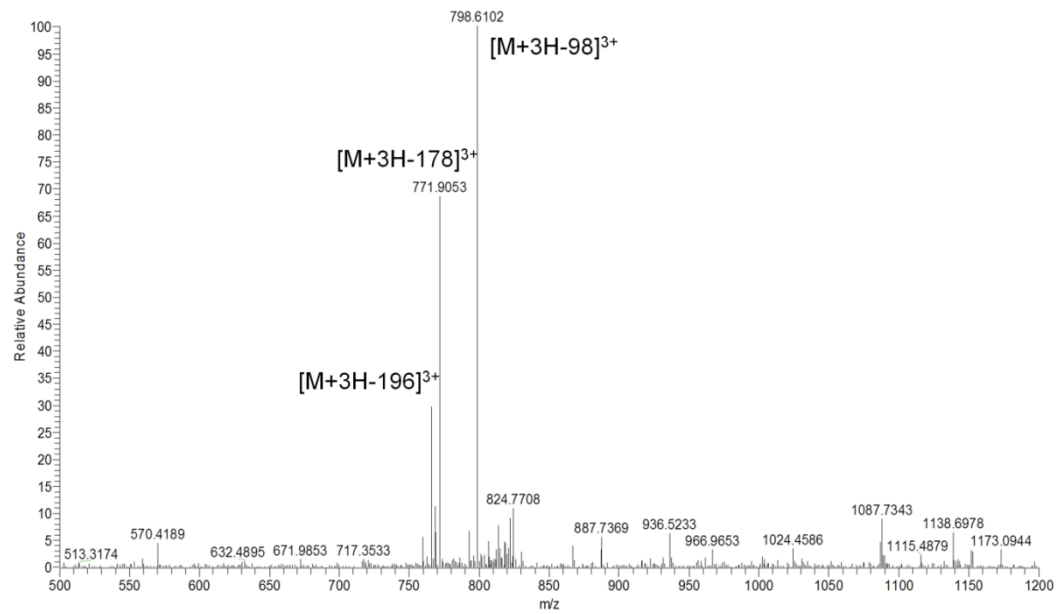


Totalionenstrom (TIC) einer Pyrophosphopeptide enthaltende Probe.



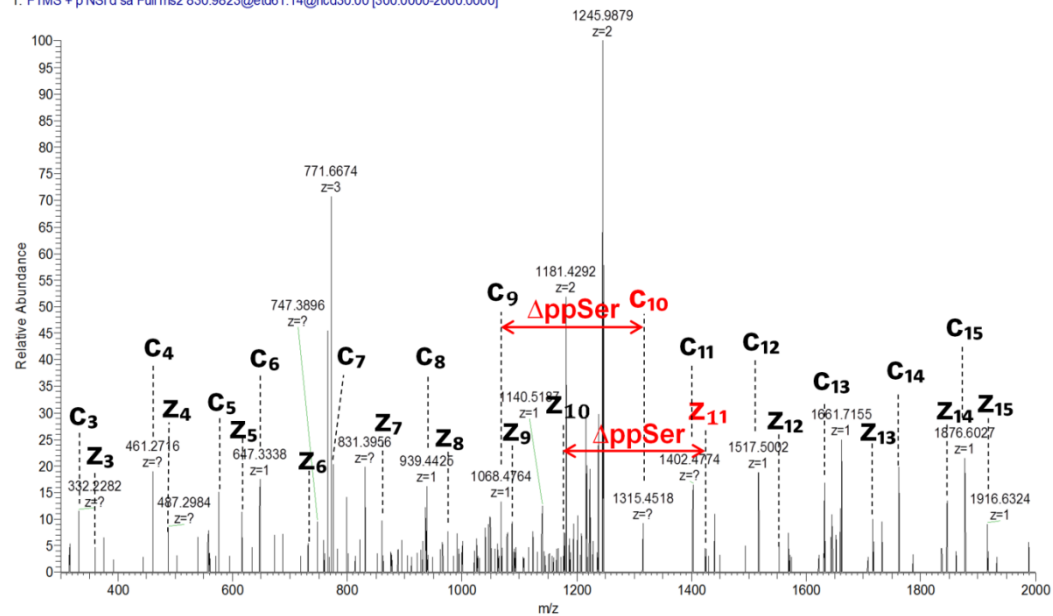
Extrahiertes Ionenchromatogramm (XIC) m/z 830,983 des diphosphorylierten Peptides SKVEDAE-YEpSpSDDEDEKLDK und des Pyrophosphopeptides SKVEDAEYEppSDDEDEKLDK.

MP08_Zn-DPA-X_139-desalted_CID25%_tit_ETHcD_160112142145 #8402 RT: 35.00 AV: 1 NL: 3.97E4
F: FTMS + c NSI r d Full ms2 830.9822@cid25.00 [178.0000-2000.0000]

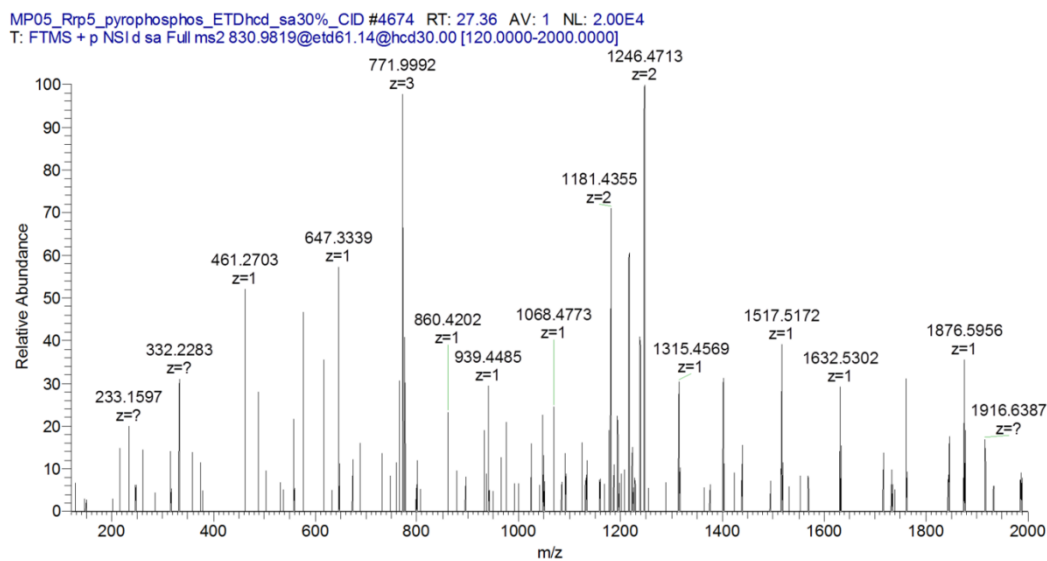


CID MS/MS Spektrum und Neutralverlustmuster des pyrophosphorylierten Peptides SKVEDAEYEppSSDDEDEKLDK (Retentionszeit: 35,00 min; Scannummer: 8402).

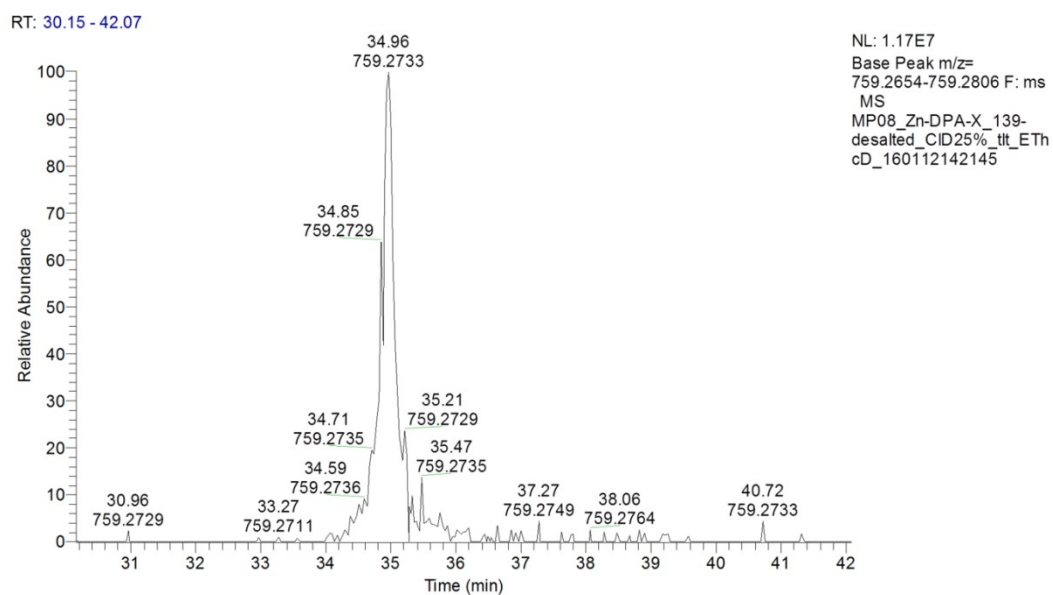
MP08_Zn-DPA-X_139-desalted_CID25%_tit_ETHcD_160112142145 #8404 RT: 35.01 AV: 1 NL: 3.73E4
T: FTMS + p NSI d sa Full ms2 830.9823@cid61.14@hcd30.00 [300.0000-2000.0000]



Getriggertes ETHcD MS/MS Spektrum mit Fragmentionenzuordnung des pyrophosphorylierten Peptides SKVEDAEYEppSSDDEDEKLDK (Retentionszeit: 35,01 min; Scannummer: 8404).

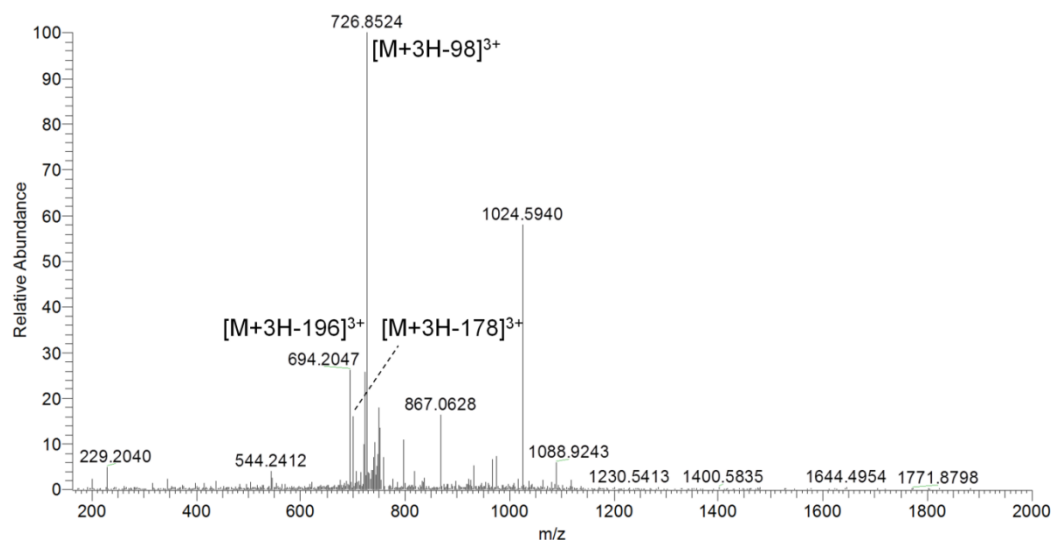


EThcD MS/MS Spektrum des synthetischen Referenzpeptides SKVEDAEYEppSSDDEDEKLDK (PP-6).



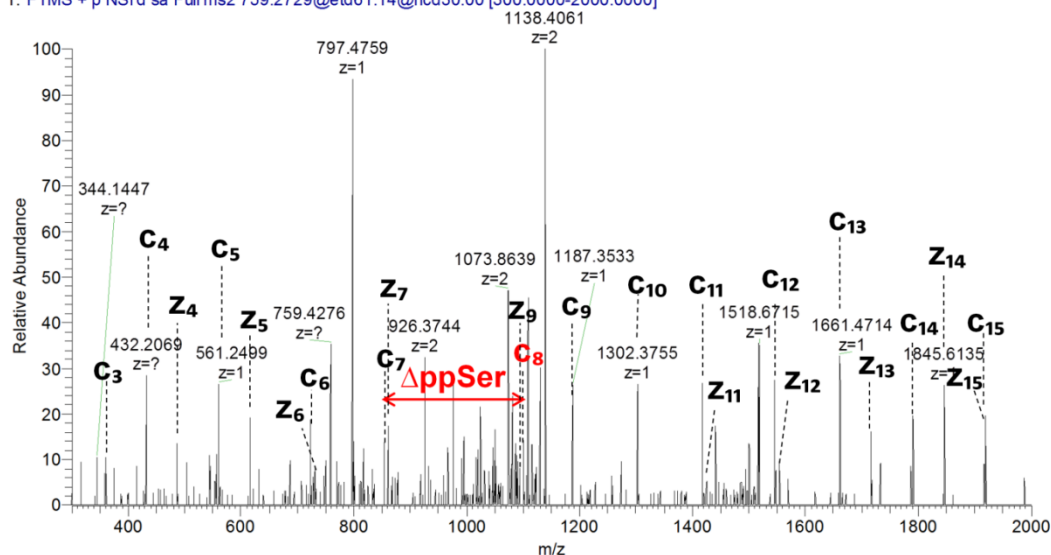
Extrahiertes Ionenchromatogramm (XIC) m/z 759,273 des diphosphorylierten Peptides VEDAEYEppSSDDEDEKLDK und des Pyrophosphopeptides VEDAEYEppSSDDEDEKLDK.

MP08_Zn-DPA-X_139-desalted_CID25%_tit_EThcD_160112142145 #8667 RT: 35.33 AV: 1 NL: 2.35E4
F: ITMS + c NSI r d Full ms2 759.2729@cid25.00 [162.0000-2000.0000]

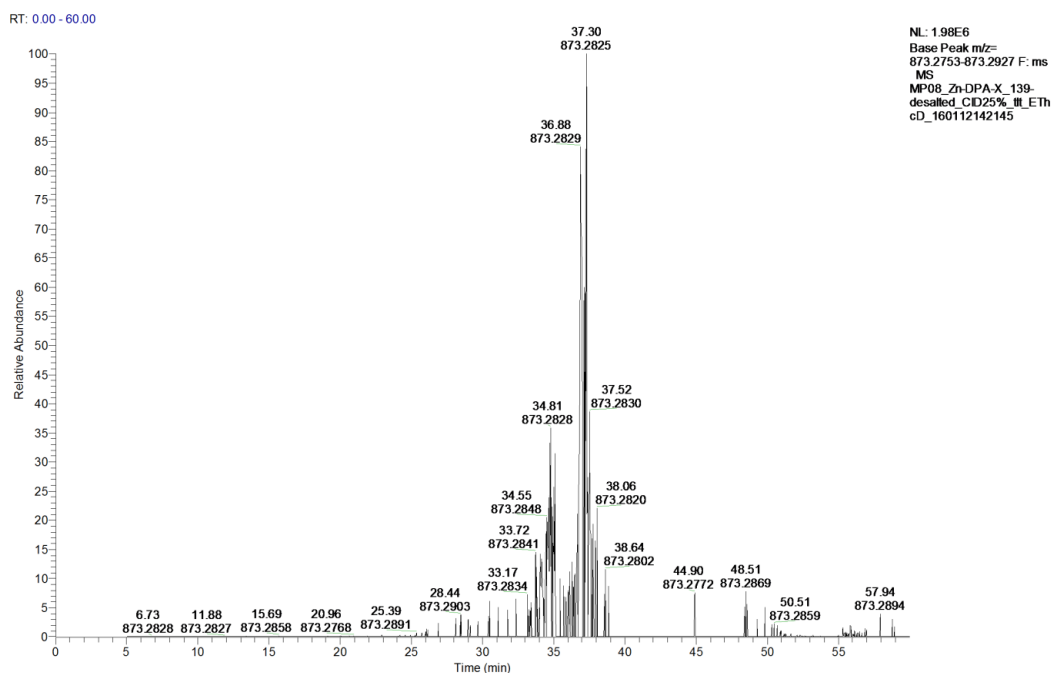


CID MS/MS Spektrum und Neutralverlustmuster des pyrophosphorylierten Peptides VEDAIEYEppSSDDEDEKLDK (Retentionszeit: 35,33 min; Scannummer: 8667).

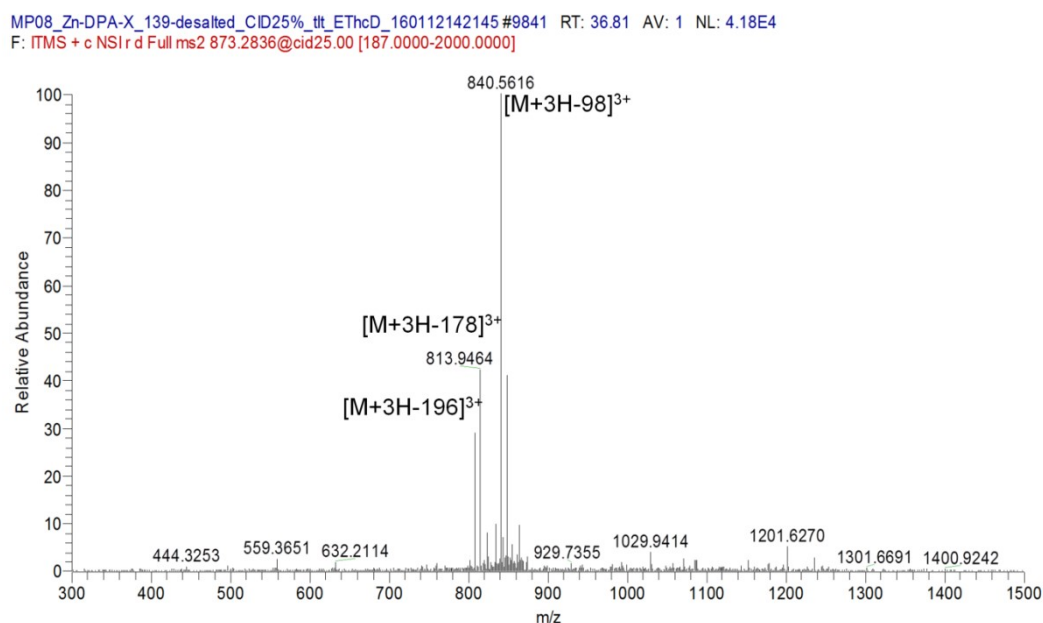
MP08_Zn-DPA-X_139-desalted_CID25%_tit_EThcD_160112142145 #8669 RT: 35.35 AV: 1 NL: 2.03E4
T: FTMS + p NSI d sa Full ms2 759.2729@etd61.14@hcd30.00 [300.0000-2000.0000]



Getriggertes EThcD MS/MS Spektrum mit Fragmentionenzuordnung des pyrophosphorylierten Peptides VEDAIEYEppSSDDEDEKLDK (Retentionszeit: 35,35 min; Scannummer: 8669).

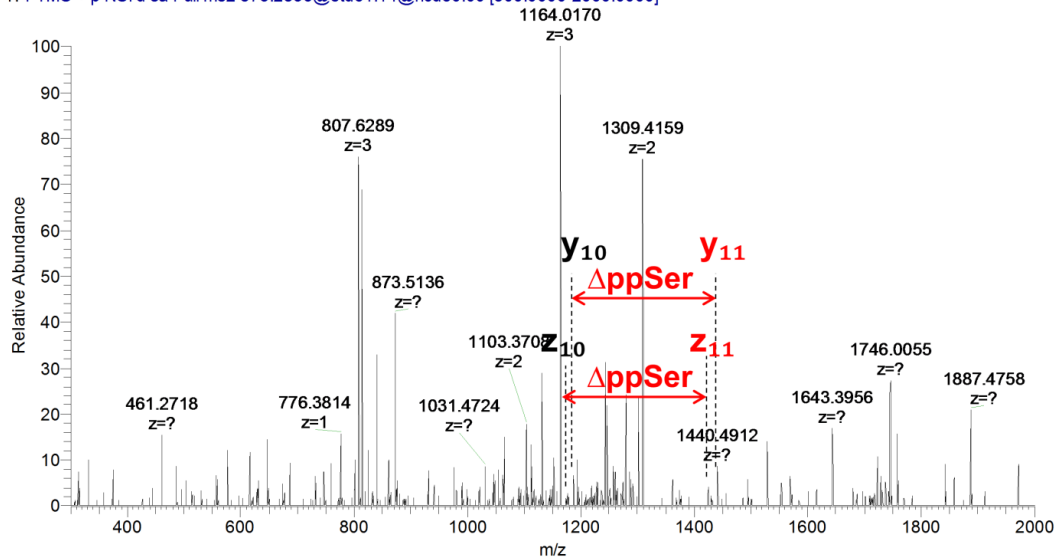


Extrahiertes Ionenchromatogramm (XIC) m/z 873,283 des Pyrophosphopeptides KSK-VEDAEYEppSSDDEDEKLDK.

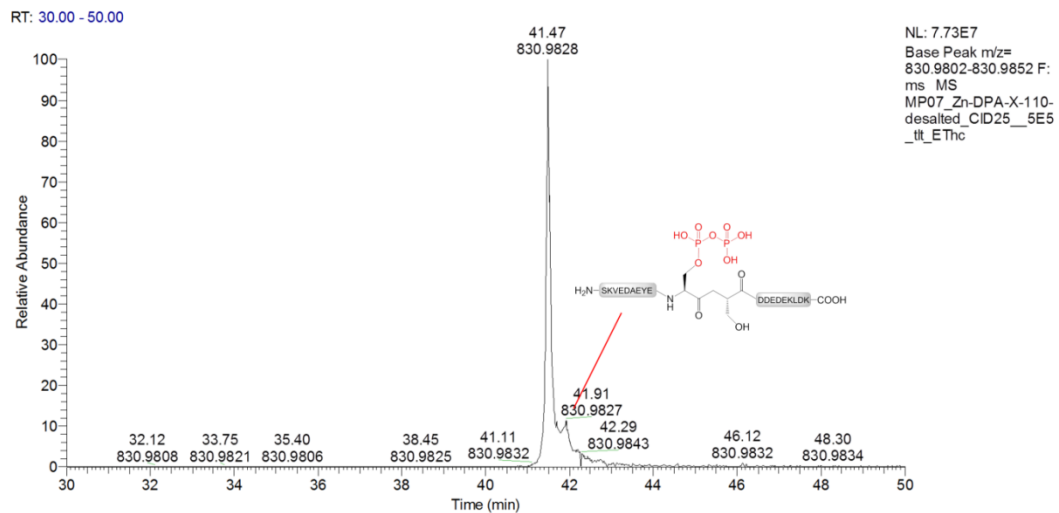


CID MS/MS Spektrum und Neutralverlustmuster des pyrophosphorylierten Peptides KSK-VEDAEYEppSSDDEDEKLDK (Retentionszeit: 36,81 min; Scannummer: 9841).

MP08_Zn-DPA-X_139-desalted_CID25%_tit_EThcD_160112142145 #9843 RT: 36.83 AV: 1 NL: 3.59E4
T: FTMS + p NSI d sa Full ms2 873.2836@etd61.14@hcd30.00 [300.0000-2000.0000]

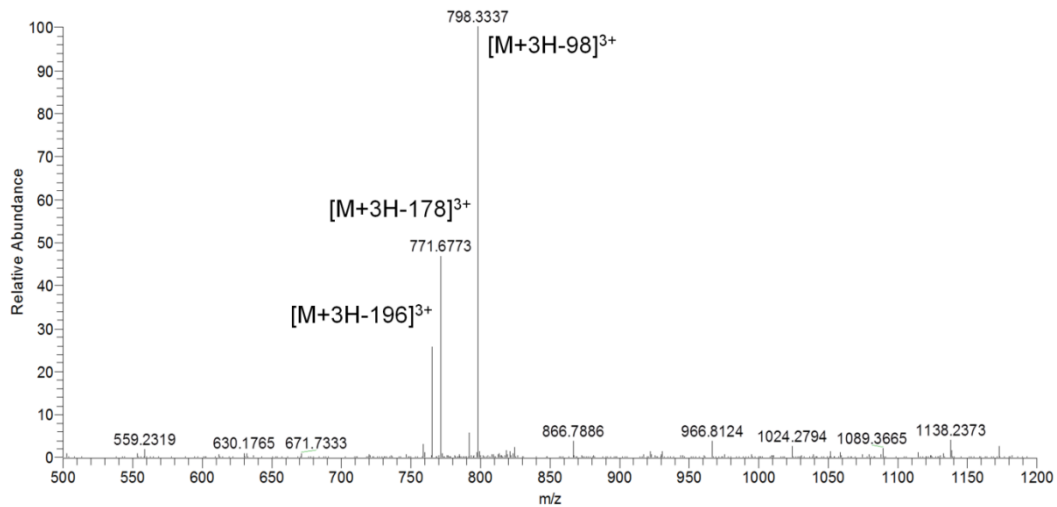


EThcD MS/MS Spektrum und Neutralverlustmuster des pyrophosphorylierten Peptides KSKVEDAEYEppSSDDEDEKLDK (Retentionszeit: 36,83 min; Scannummer: 9843).



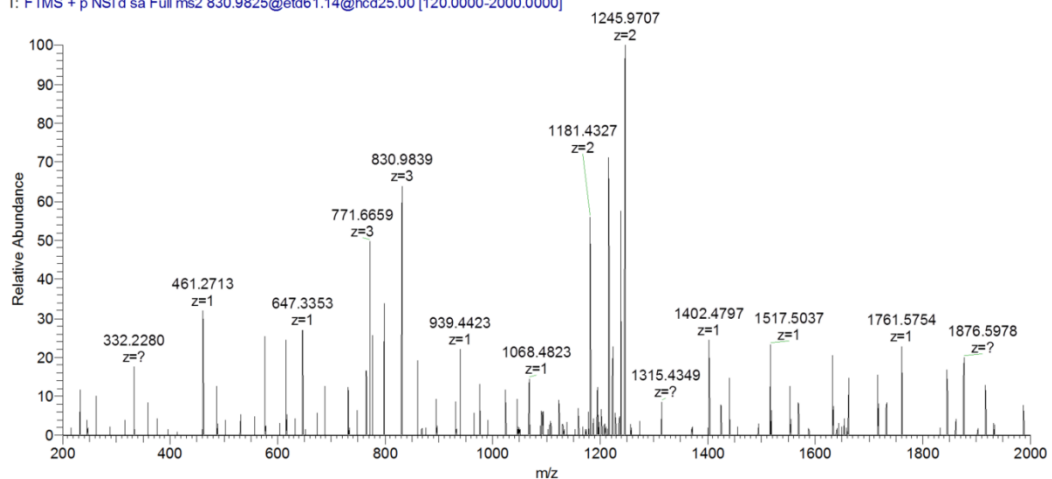
Extrahiertes Ionenchromatogramm (XIC) m/z 830,983 des diphosphorylierten Peptides SKVEDAEYEppSSDDEDEKLDK und des Pyrophosphopeptides SKVEDAEYEppSSDDEDEKLDK.

MP07_Zn-DPA-X-110-desalted_CID25_5E5_tlt_EThc #7176 RT: 42.02 AV: 1 NL: 1.45E5
F: ITMS + c NSI r d Full ms2 830.9816@cid25.00 [178.0000-2000.0000]

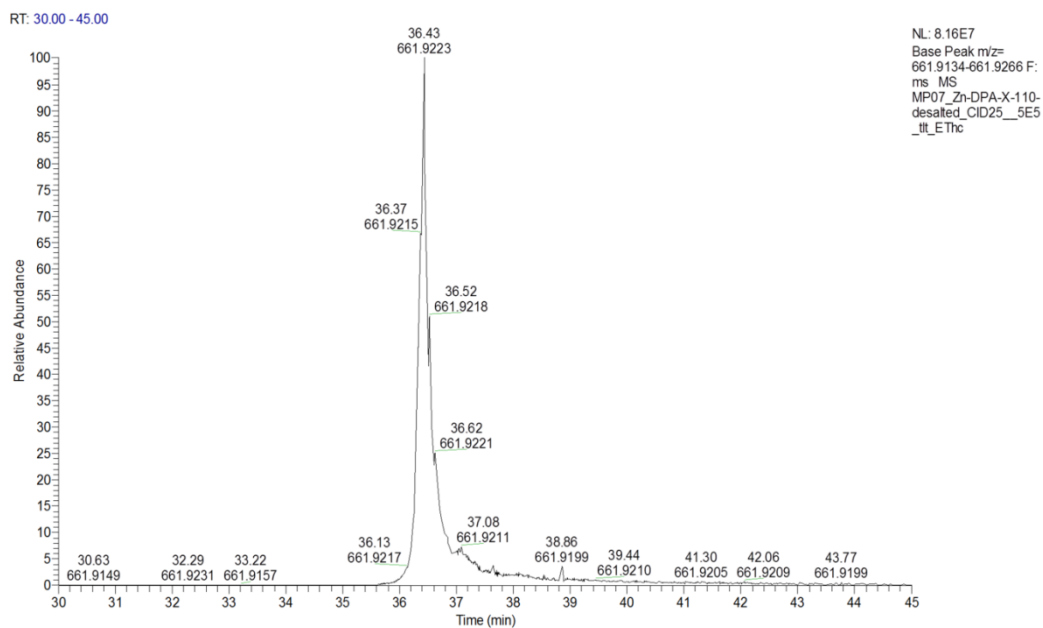


CID MS/MS Spektrum und Neutralverlustmuster des pyrophosphorylierten Peptides SKVEDAEYppSSDDEDEKLDK (Retentionszeit: 42,02 min; Scannummer: 7176).

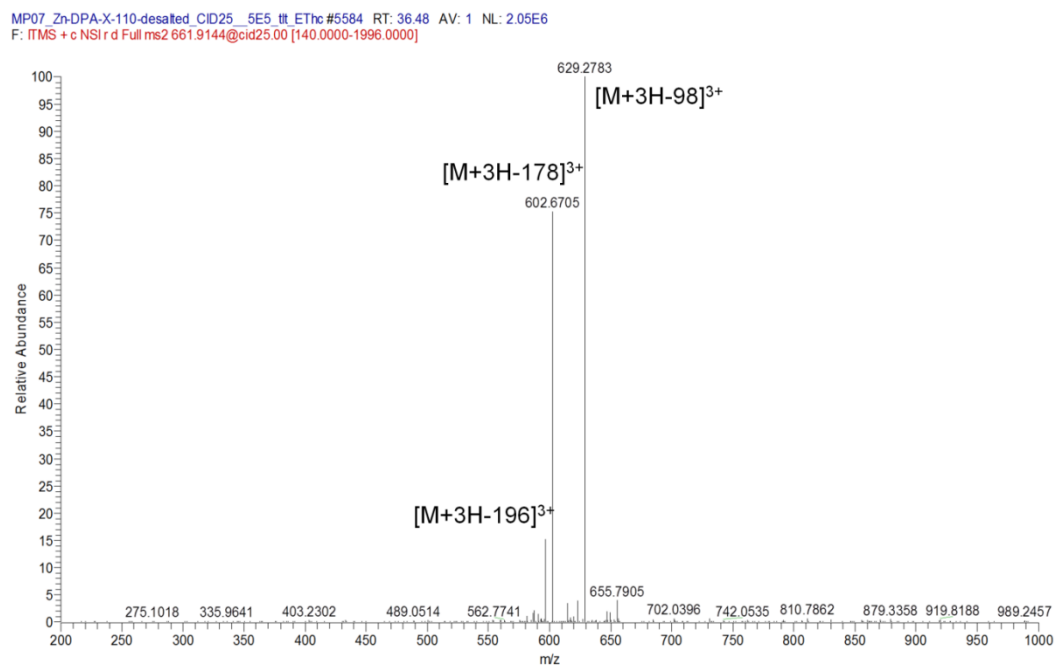
MP07_Zn-DPA-X-110-desalted_CID25_5E5_tlt_EThc #7178 RT: 42.03 AV: 1 NL: 5.70E4
T: FTMS + p NSI d sa Full ms2 830.9825@etd61.14@hcd25.00 [120.0000-2000.0000]



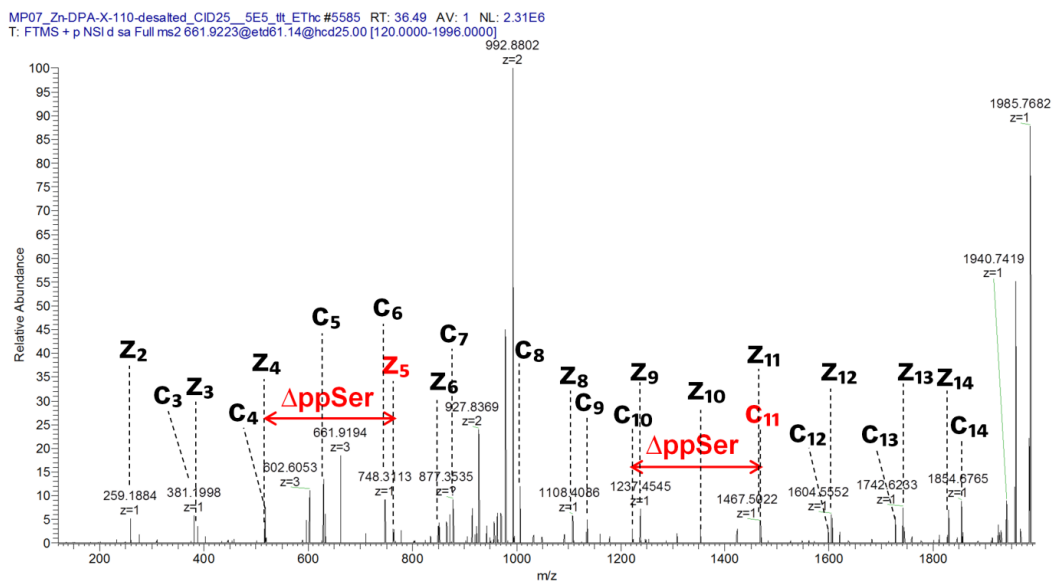
Getriggertes EThcD MS/MS Spektrum des pyrophosphorylierten Peptides SKVEDAEYppSSDDEDEKLDK (Retentionszeit: 42,03 min; Scannummer: 7178).



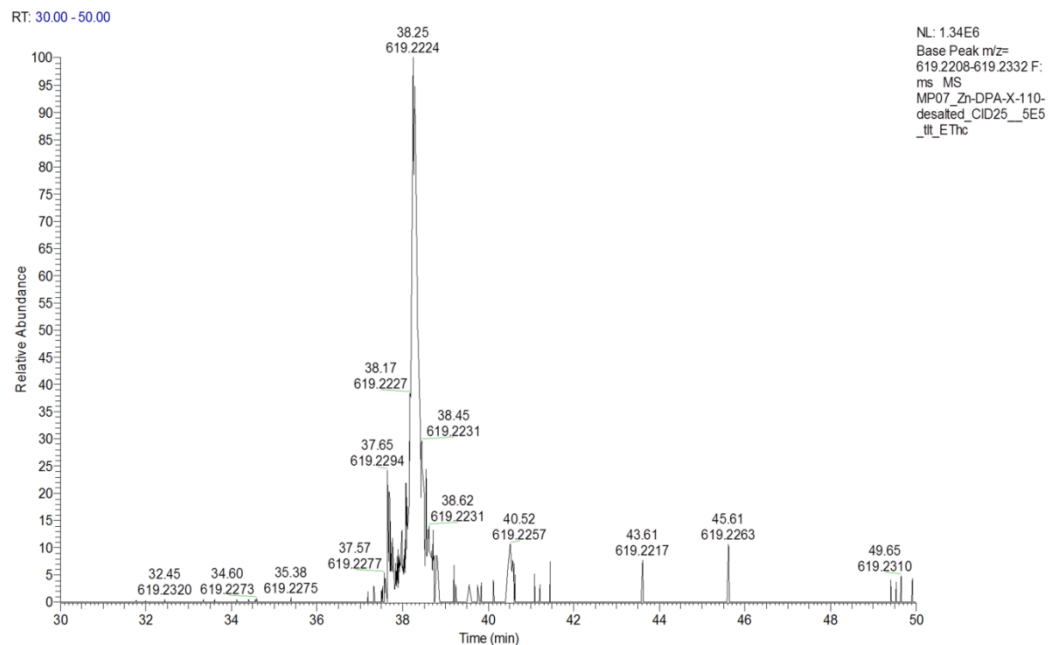
Extrahiertes Ionenchromatogramm (XIC) m/z 661,913 des Pyrophosphopeptides R(-NH₃)SHHDDEEESppSEKK.



CID MS/MS Spektrum und Neutralverlustmuster des pyrophosphorylierten Peptides R(-NH₃)SHHDDEEESppSEKK. (Retentionszeit: 36,48 min; Scannummer: 5584).

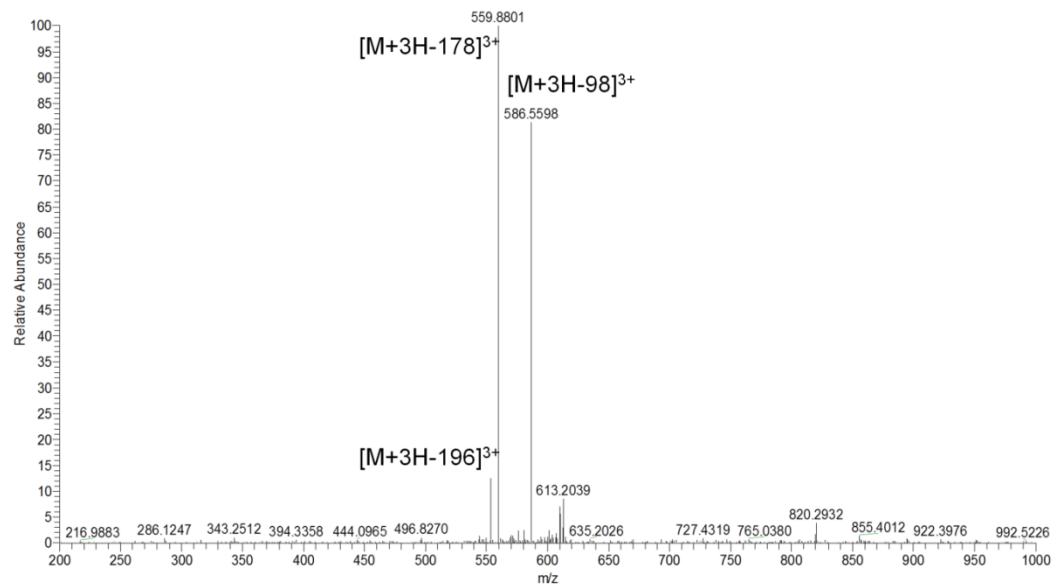


Getriggertes EThcD MS/MS Spektrum und Sequenzabdeckung des pyrophosphorylierten Peptides R(-NH₃)SHHDDEEESppSEKK. (Retentionszeit: 36,49 min; Scannummer: 5585).



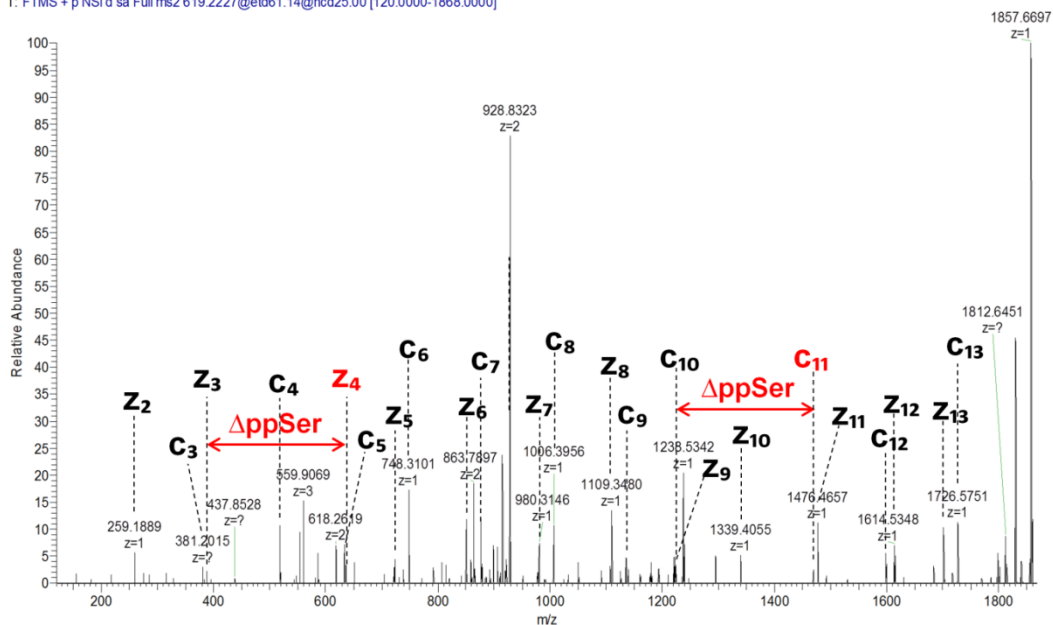
Extrahiertes Ionenchromatogramm (XIC) m/z 619,223 des Pyrophosphopeptides R(-NH₃)SHHDDEEESppSEK.

MP07_Zn-DPA-X-110-desalted_CID25_5E5_III_EThc #5949 RT: 38.18 AV: 1 NL: 3.06E4
F: FTMS + c NSI r d Full ms2 619.2227@cid25.00 [131.0000-1868.0000]

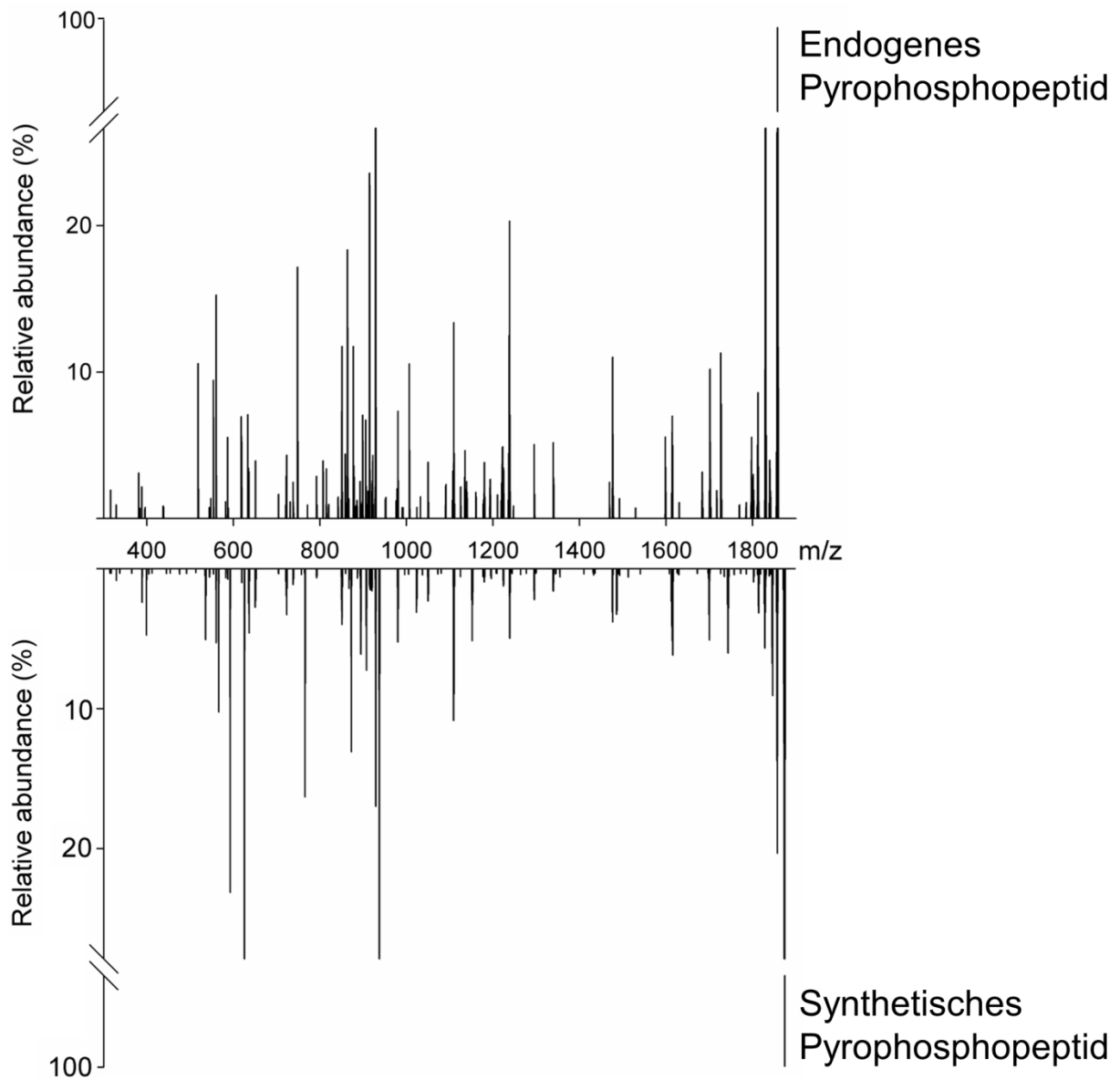


CID MS/MS Spektrum und Neutralverlustmuster des pyrophosphorylierten Peptides R(-NH₃)SHHDDEEESppSEK. (Retentionszeit: 38,18 min; Scannummer: 5949).

MP07_Zn-DPA-X-110-desalted_CID25_5E5_III_EThc #5950 RT: 38.18 AV: 1 NL: 4.46E4
T: FTMS + p NSI d sa Full ms2 619.2227@etd61.14@hcd25.00 [120.0000-1868.0000]



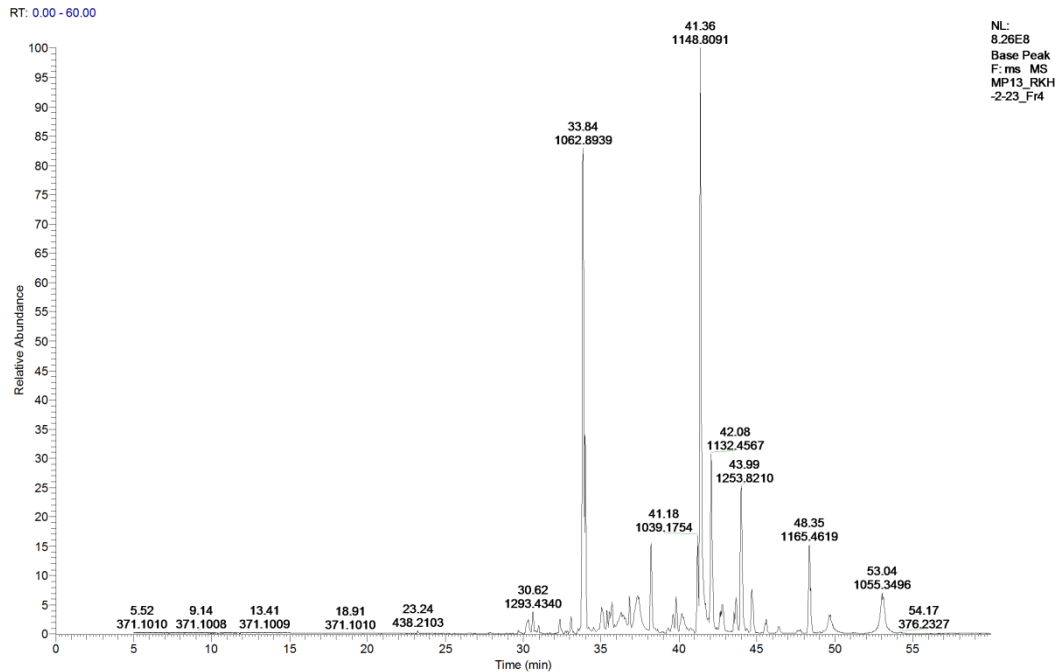
Getriggertes EThcD MS/MS Spektrum des pyrophosphorylierten Peptides R(-NH₃)SHHDDEEESppSEK (Retentionszeit: 38,18 min; Scannummer: 5950).



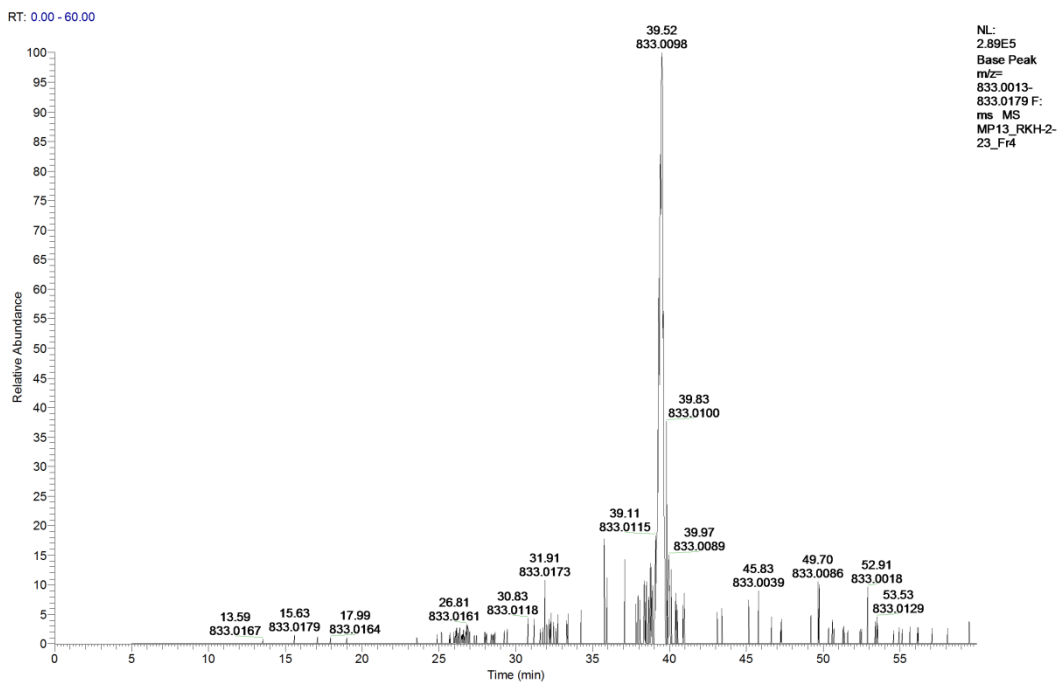
Vergleichende Darstellung der EThcD Spektren des endogenen Pyrophosphopeptides $R(-NH_3)SHHDDEEESppSEKK$ und des synthetischen Pyrophosphopeptides $RSHHDDEEESppSEKK$ in einer Spiegelbilddarstellung.

Charakterisierung endogener Proteinpyrophosphorylierungen in HEK 293

Ergebnisse erzielt mit der Neutralverlusttrigger-ETHcD-Methode

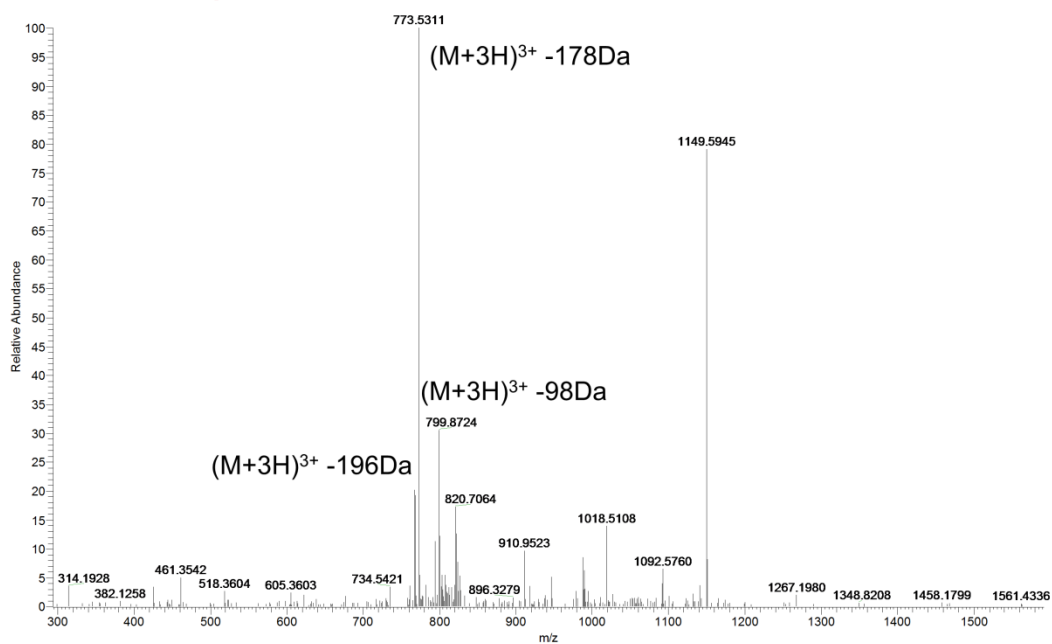


Totalionenstrom (TIC) einer Fraktion, welche das Pyrophosphopeptid VVDFGSATYDDEHHST-LVppSTR enthielt.



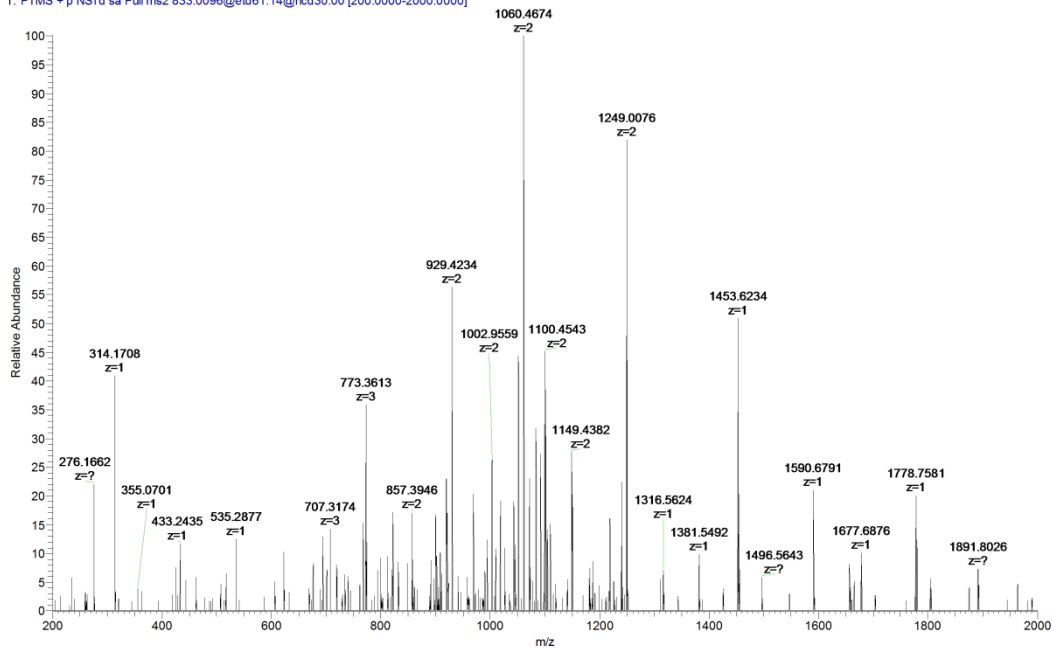
Extrahiertes Ionenchromatogramm (XIC) m/z 833,010 des Pyrophosphopeptides VVDFGSATYDDEHHSTLVppSTR.

MP13_RKH-2-23_Fr4 #8597 RT: 39.36 AV: 1 NL: 3.64E3
F: FTMS + c NSI rd Full ms2 833.0096@cid25.00 [178.0000-2000.0000]

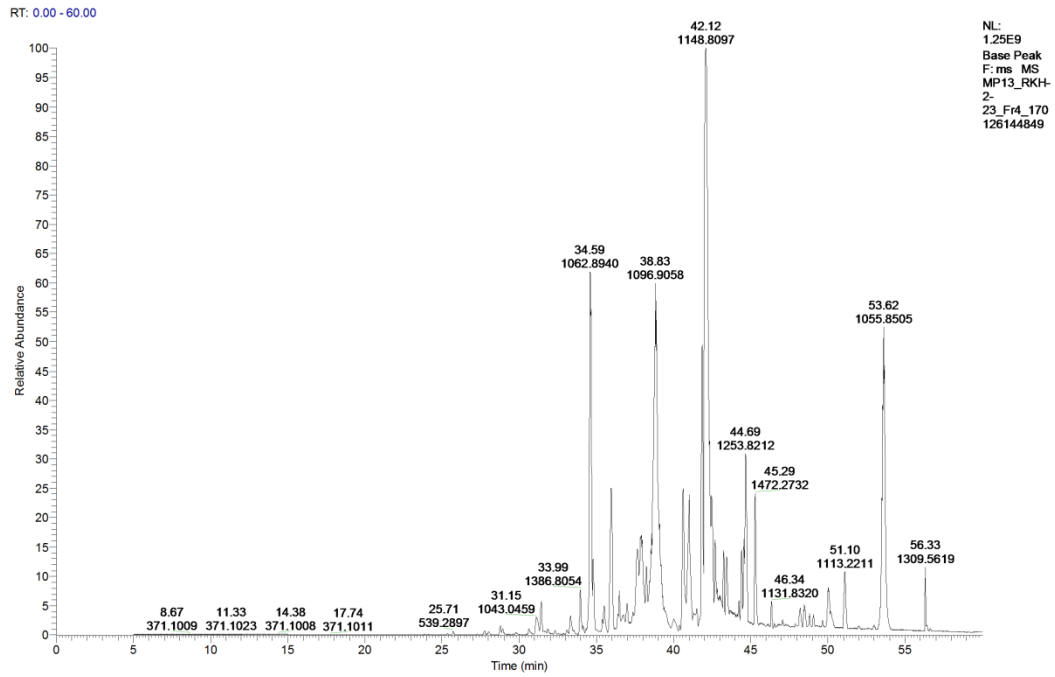


CID MS/MS Spektrum und Neutralverlustmuster des pyrophosphorylierten Peptides
VVDFGSATYDDEHHSTLVppSTR (Retentionszeit: 39,36 min; Scannummer: 8597).

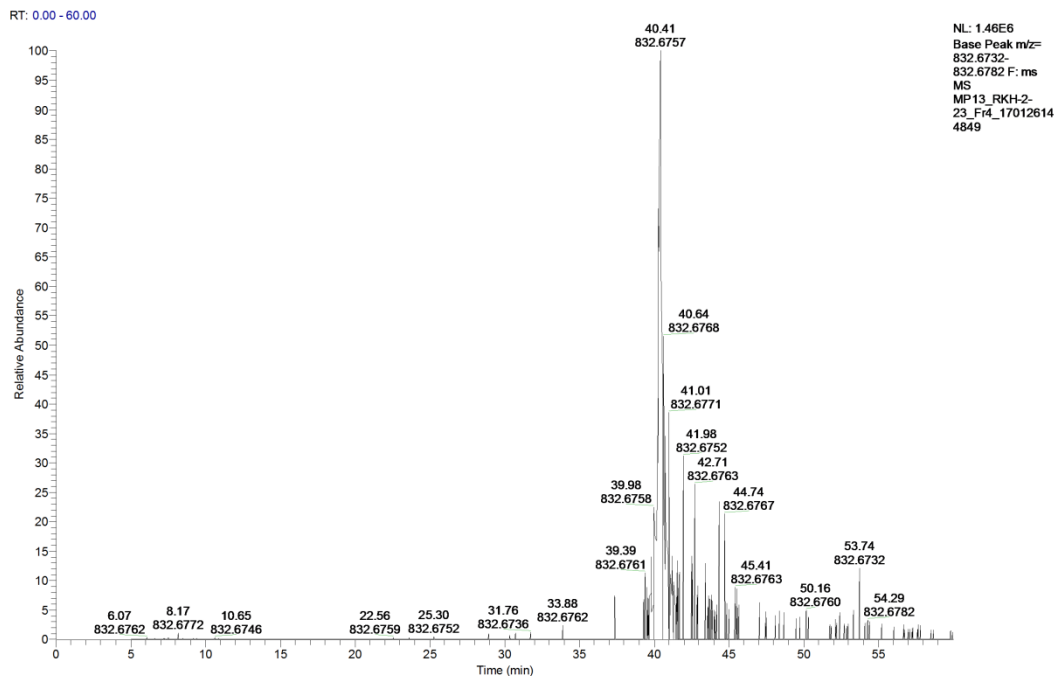
MP13_RKH-2-23_Fr4 #8599 RT: 39.38 AV: 1 NL: 1.14E4
T: FTMS + p NSI d sa Full ms2 833.0096@etd61.14@hcd30.00 [200.0000-2000.0000]



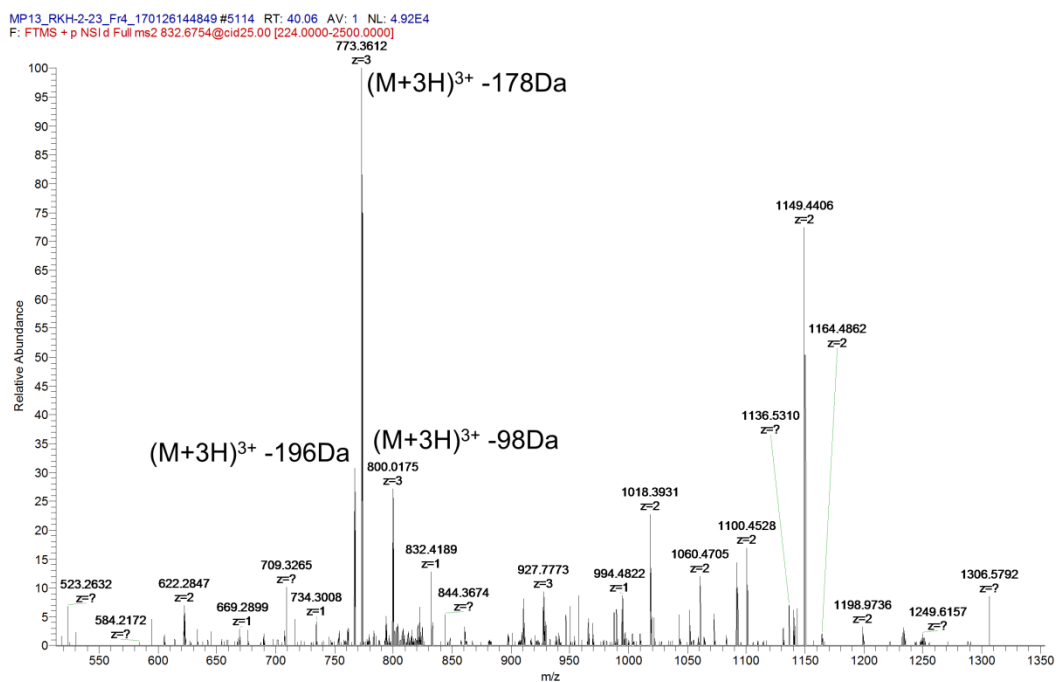
Getriggertes EThcD MS/MS Spektrum des pyrophosphorylierten Peptides
VVDFGSATYDDEHHSTLVppSTR (Retentionszeit: 39,38 min; Scannummer: 8599).



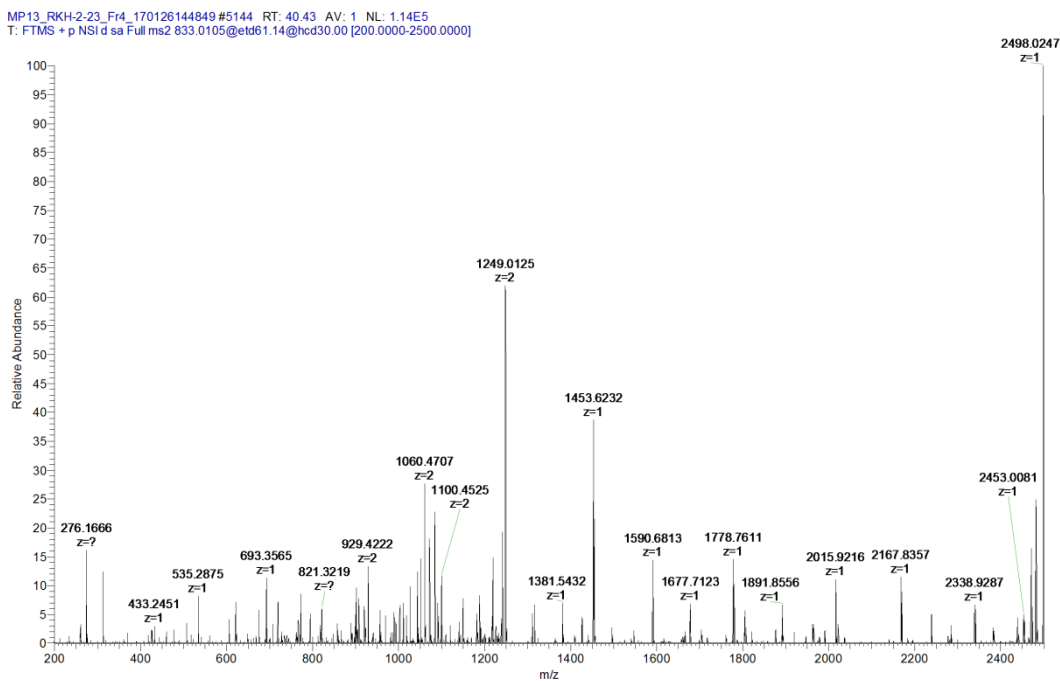
Totalionenstrom (TIC) einer Fraktion, welche das Pyrophosphopeptid VVDFGSATYDDEHHST-LVppSTR enthielt.



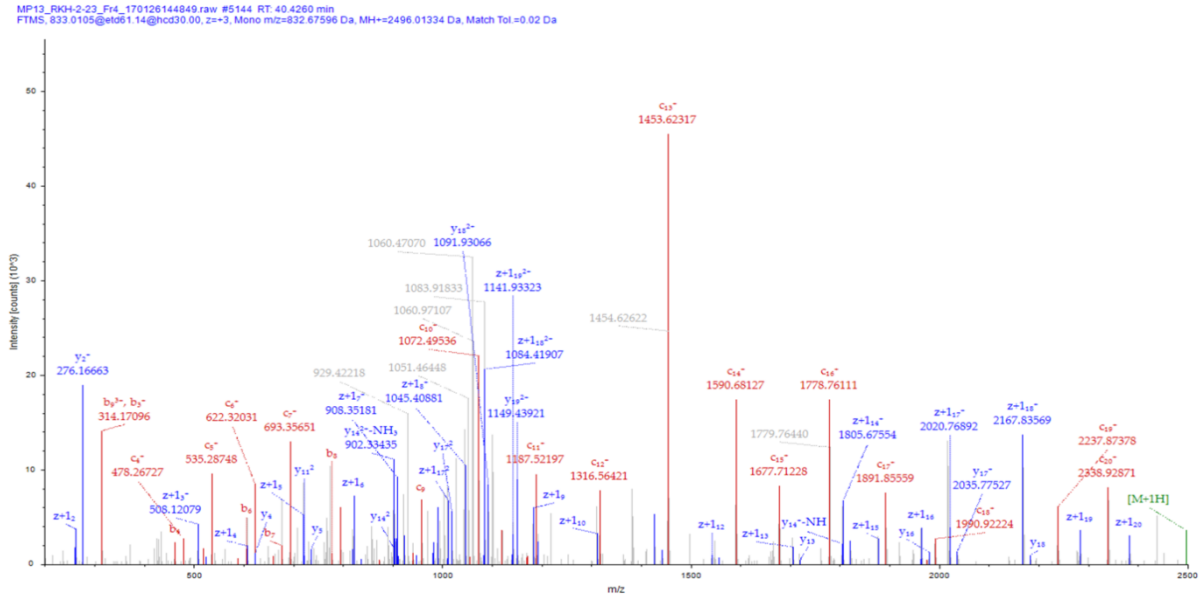
Extrahiertes Ionenchromatogramm (XIC) m/z 832,676 des Pyrophosphopeptides VVDFGSATYDDEHHSTLVppSTR.



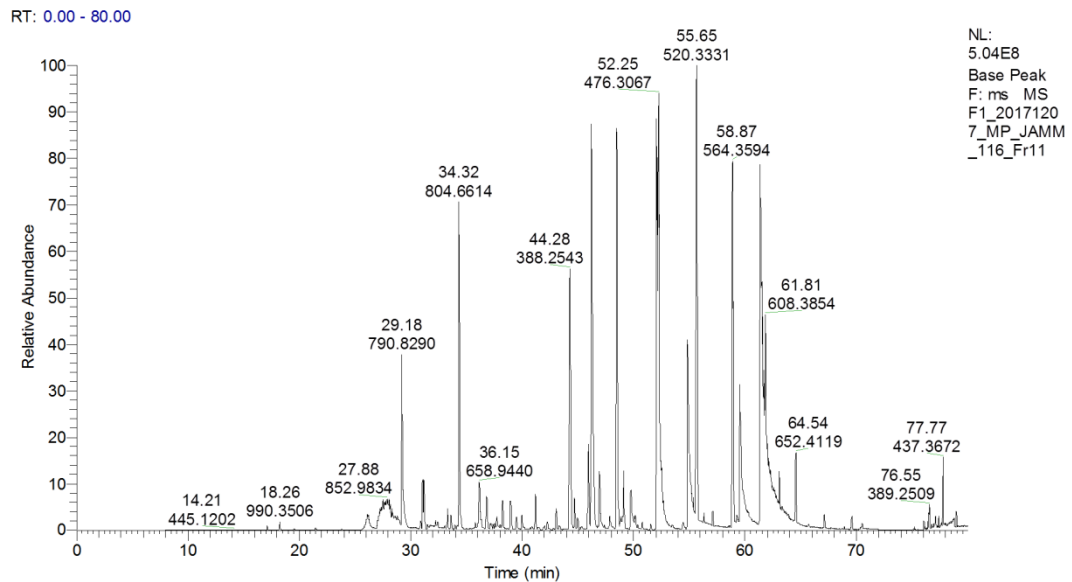
CID MS/MS Spektrum und Neutralverlustmuster des pyrophosphorylierten Peptides
VVDFGSATYDDEHHSTLVppSTR (Retentionszeit: 40,06 min; Scannummer: 5114).



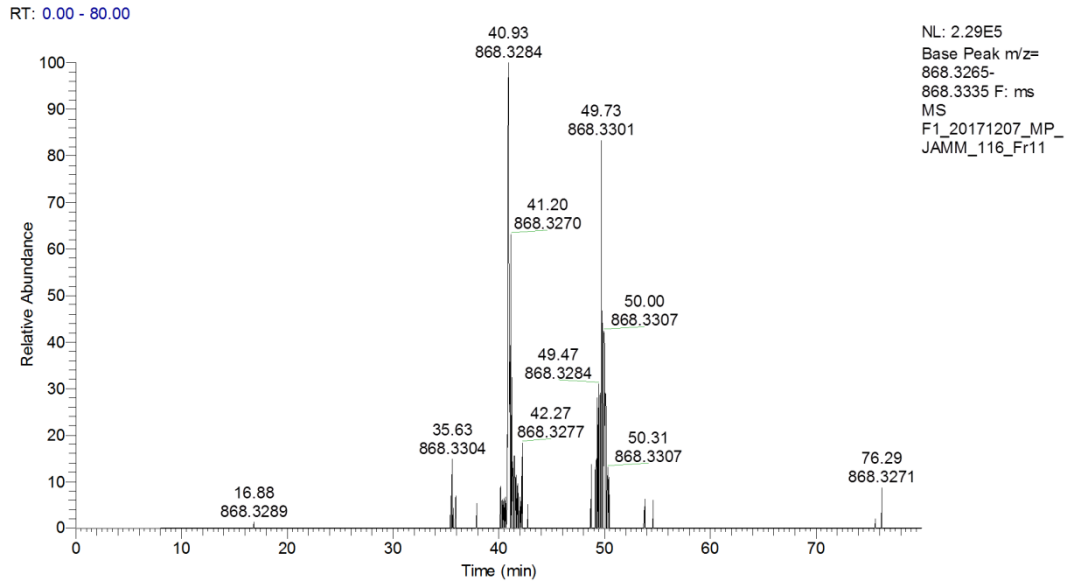
Getriggertes EThcD MS/MS Spektrum des pyrophosphorylierten Peptides
VVDFGSATYDDEHHSTLVppSTR (Retentionszeit: 40,43 min; Scannummer: 5144).



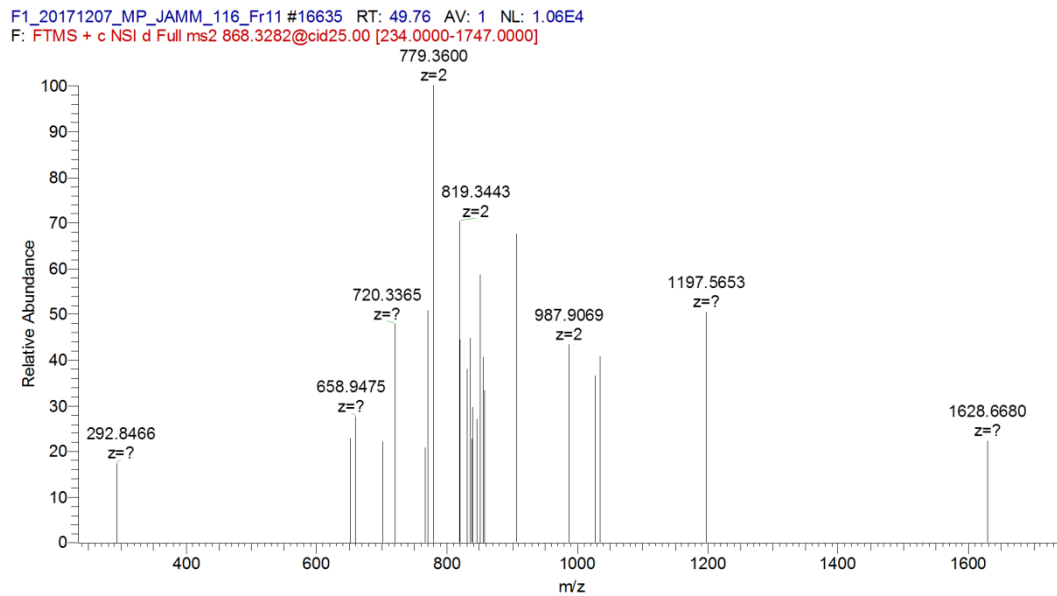
Peptide-Spektrum-Match des EThcD MS/MS Spektrums des pyrophosphorylierten Peptides VVDFGSATYDDEHHSTLVppSTR, inklusive identifizierter Fragmentationen nach Datenbanksuche mittels Sequest und *ptmRS*.



Totalionenstrom (TIC) einer Fraktion, welche das Pyrophosphopeptid YppSGAYGASVSDEELK enthielt.

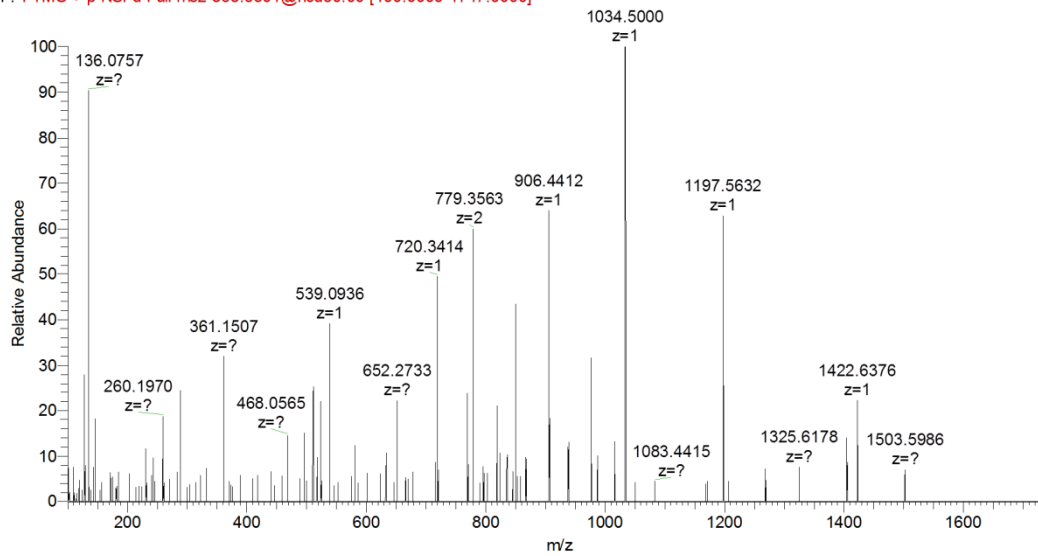


Extrahiertes Ionenchromatogramm (XIC) m/z 868,328 des Pyrophosphopeptides YppSGAYGASVSDEELK.



CID MS/MS Spektrum des pyrophosphorylierten Peptides YppSGAYGASVSDEELK (Retentionszeit: 49,76 min; Scannummer: 16635).

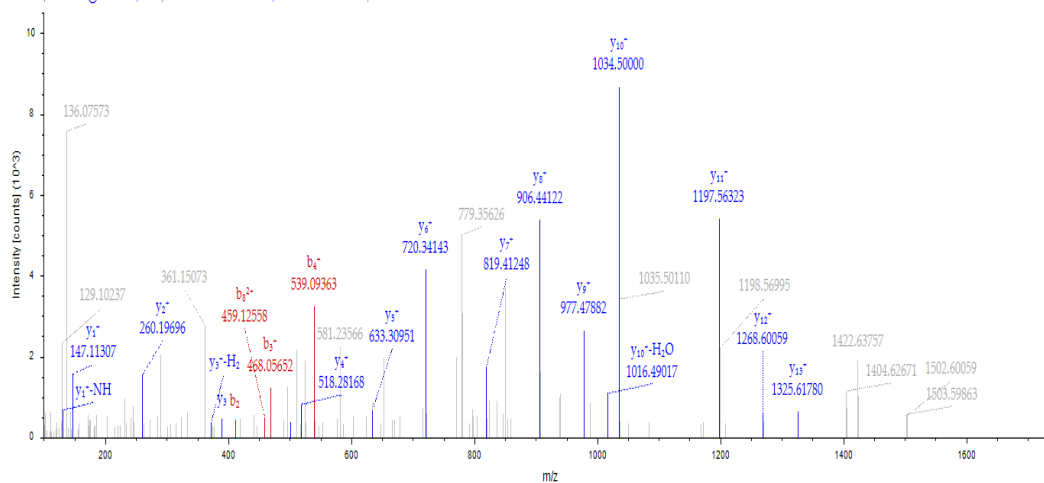
F1_20171207_MP_JAMM_116_Fr11 #16637 RT: 49.78 AV: 1 NL: 8.29E3
F: FTMS + p NSI d Full ms2 868.3301@hcd30.00 [100.0000-1747.0000]



Getriggertes HCD MS/MS Spektrum des pyrophosphorylierten Peptides

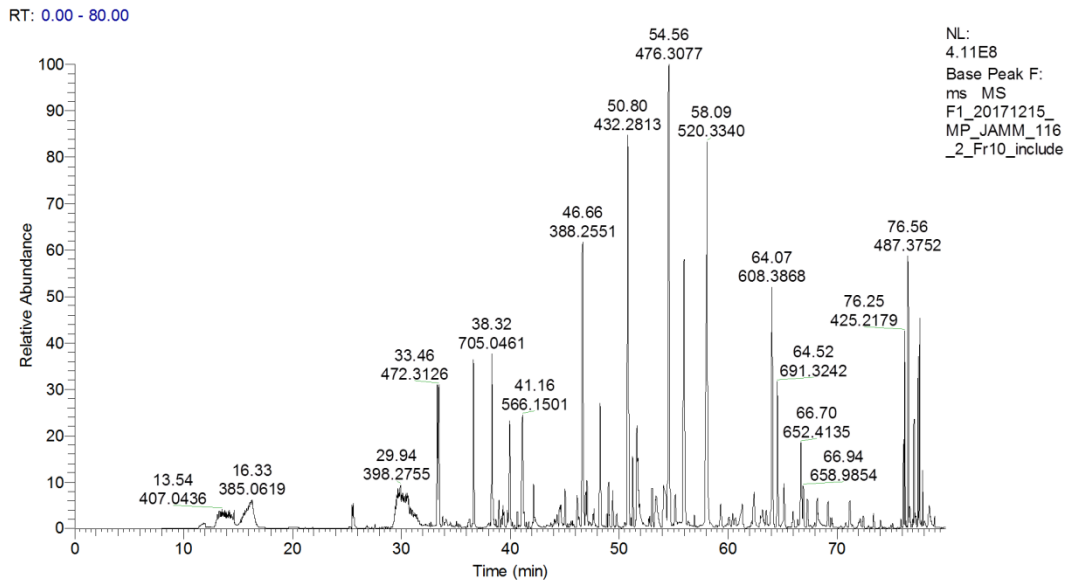
YppSGAYGASVSDEELK (Retentionszeit: 49,78 min; Scannummer: 16637).

F1_20171207_MP_JAMM_116_Fr11.raw #16637 RT: 49.7845 min
FTMS, 868.3301@hcd30.00, z=2, Mono m/z=868.33014 Da, MH+=1735.65300 Da, Match Tol.=0.02 Da

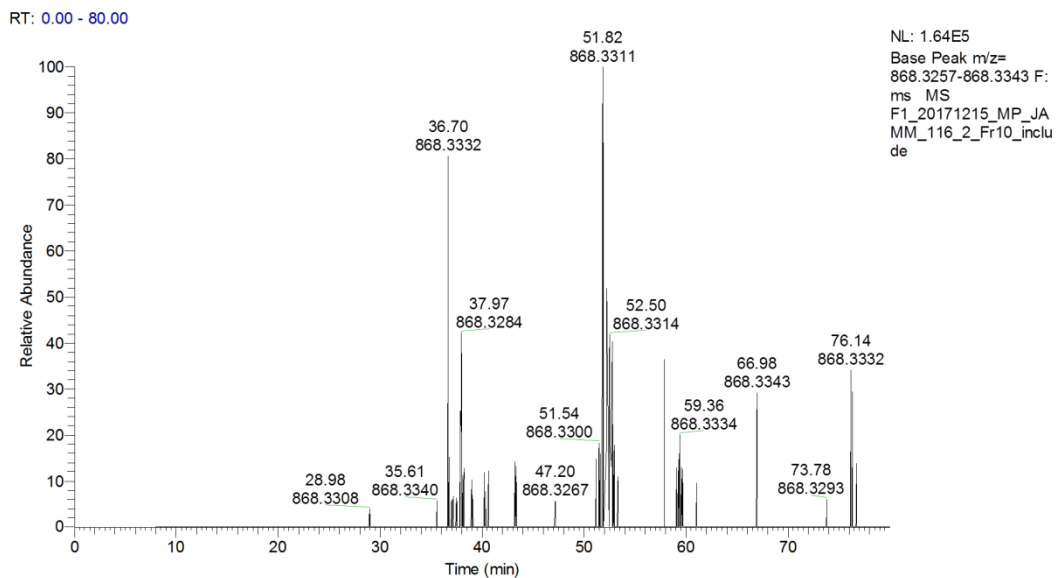


Peptide-Spektrum-Match des HCD MS/MS Spektrums des pyrophosphorylierten Peptides

YppSGAYGASVSDEELK, inklusive identifizierter Fragmentationen nach Datenbanksuche mittels Sequest und *ptmRS*.

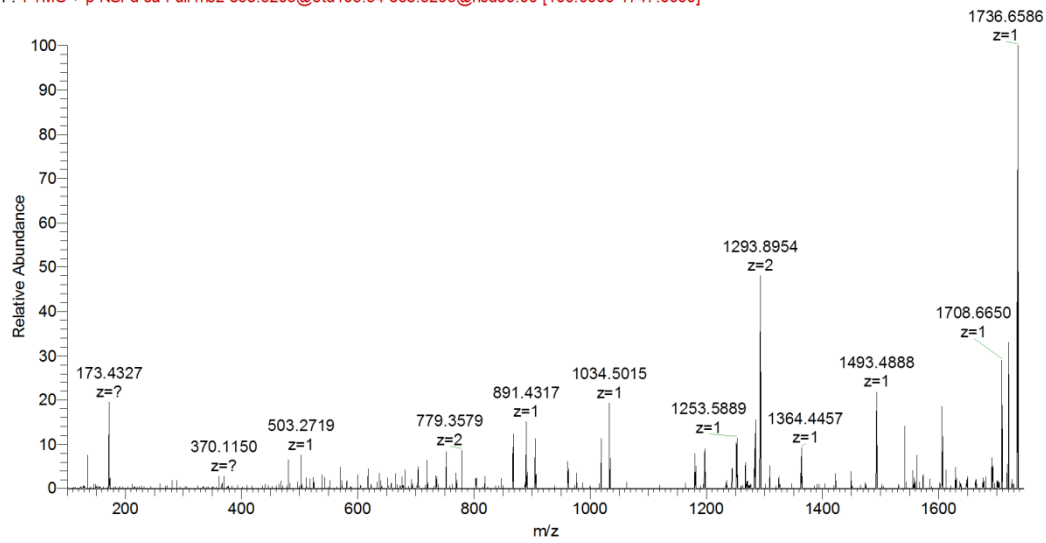


Totalionenstrom (TIC) einer Fraktion, welche das Pyrophosphopeptid YppSGAYGASVSDEELK enthielt.



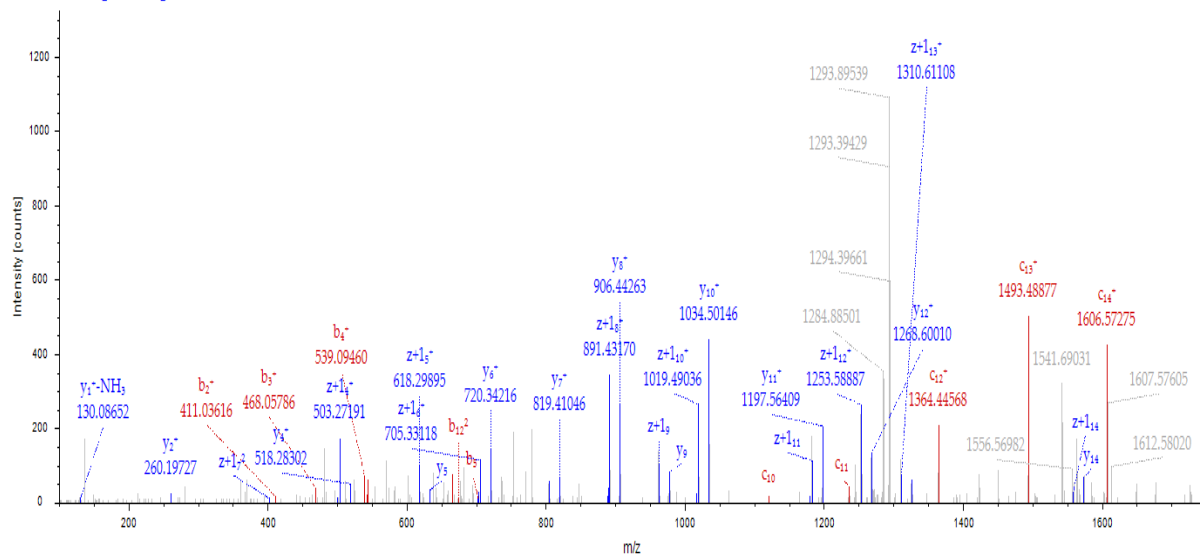
Extrahiertes Ionenchromatogramm (XIC) m/z 868,330 des Pyrophosphopeptides YppSGAYGASVSDEELK.

F1_20171215_MP_JAMM_116_2_Fr10_include #12655 RT: 52.20 AV: 1 NL: 2.26E3
F: FTMS + p NSI d sa Full ms2 868.3295@etd105.54 868.3295@hcd30.00 [100.0000-1747.0000]



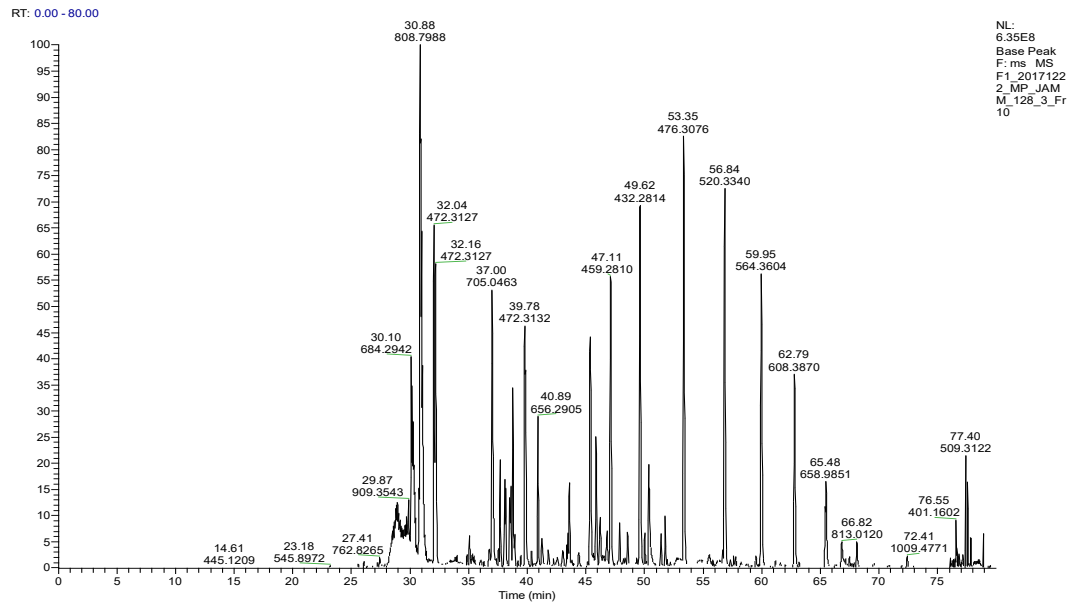
Getriggertes EThcD MS/MS Spektrum des pyrophosphorylierten Peptides YppSGAYGASVSDEELK (Retentionszeit: 52,20 min; Scannummer: 12655).

F1_20171215_MP_JAMM_116_2_Fr10_include.raw #12655 RT: 52.1992 min
FTMS, 868.3318@etd105.54@hcd30.00, z=2, Mono m/z=868.33185 Da, MH+=1735.65642 Da, Match Tol=0.05 Da

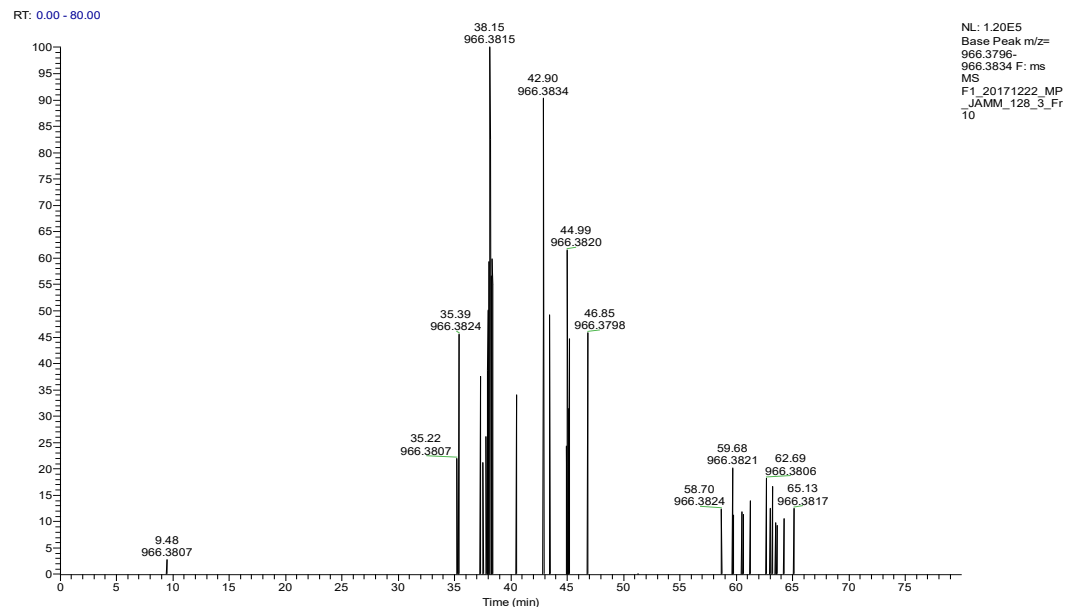


Peptide-Spektrum-Match des EThcD MS/MS Spektrums des pyrophosphorylierten Peptides YppSGAYGASVSDEELK, inklusive identifizierter Fragmentationen nach Datenbanksuche mittels Sequest und *ptmRS*.

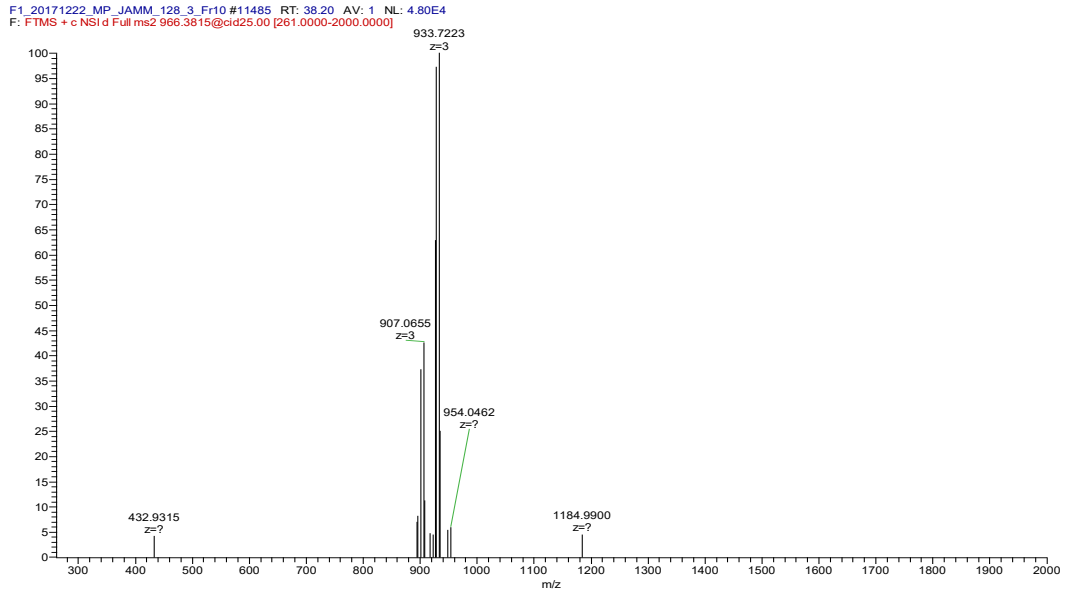
Anhang



Totalionenstrom (TIC) einer Fraktion, welche das Pyrophosphopeptid ESEDKPEIEDVGSDEEEEEK-KDGDK enthält.

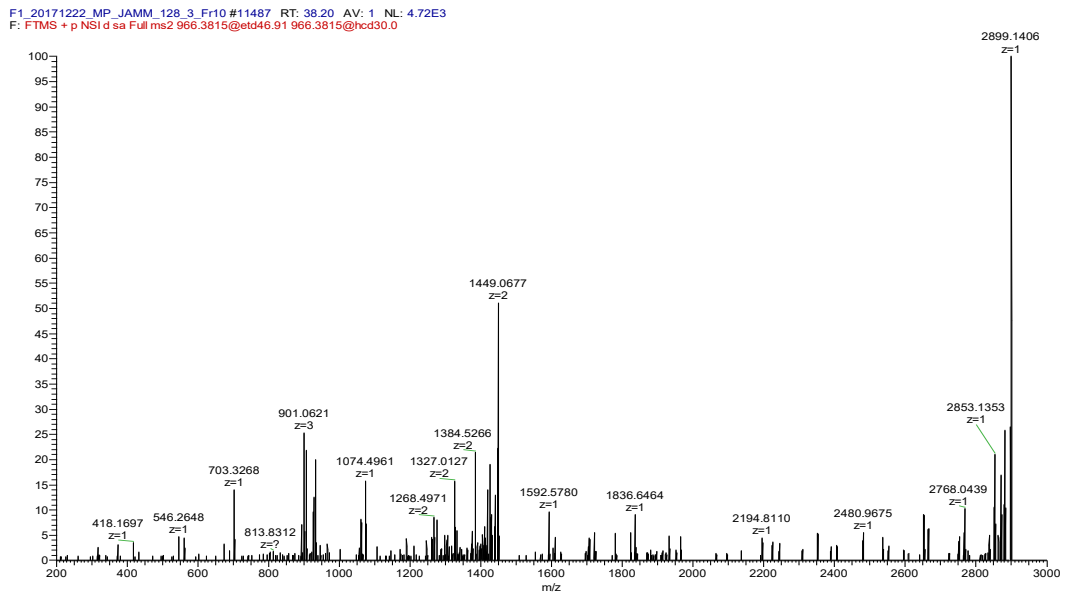


Extrahiertes Ionenchromatogramm (XIC) m/z 966,3818 des Pyrophosphopeptides ESEDKPEIEDVGSDEEEEEK-KDGDK.



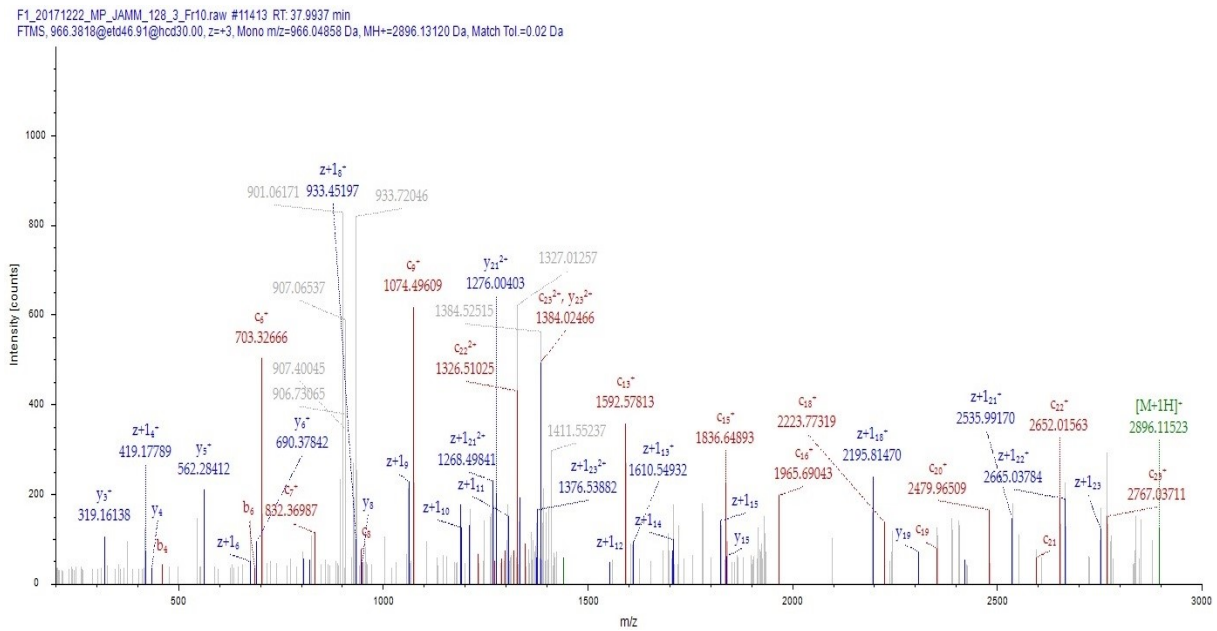
CID MS/MS Spektrum des pyrophosphorylierten Peptides

ESEDKPEIEDVGSDEEEEEKKDGDK (Retentionszeit: 38,20 min; Scannummer: 11485).

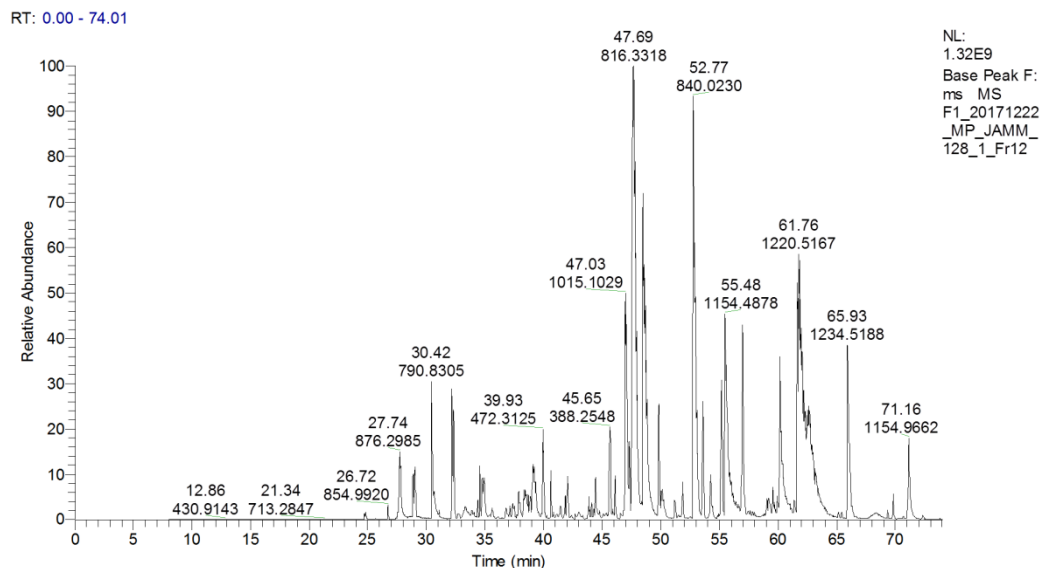


Getriggertes EThcD MS/MS Spektrum des pyrophosphorylierten Peptides

ESEDKPEIEDVGSDEEEEEKKDGDK (Retentionszeit: 38,20 min; Scannummer: 11487).

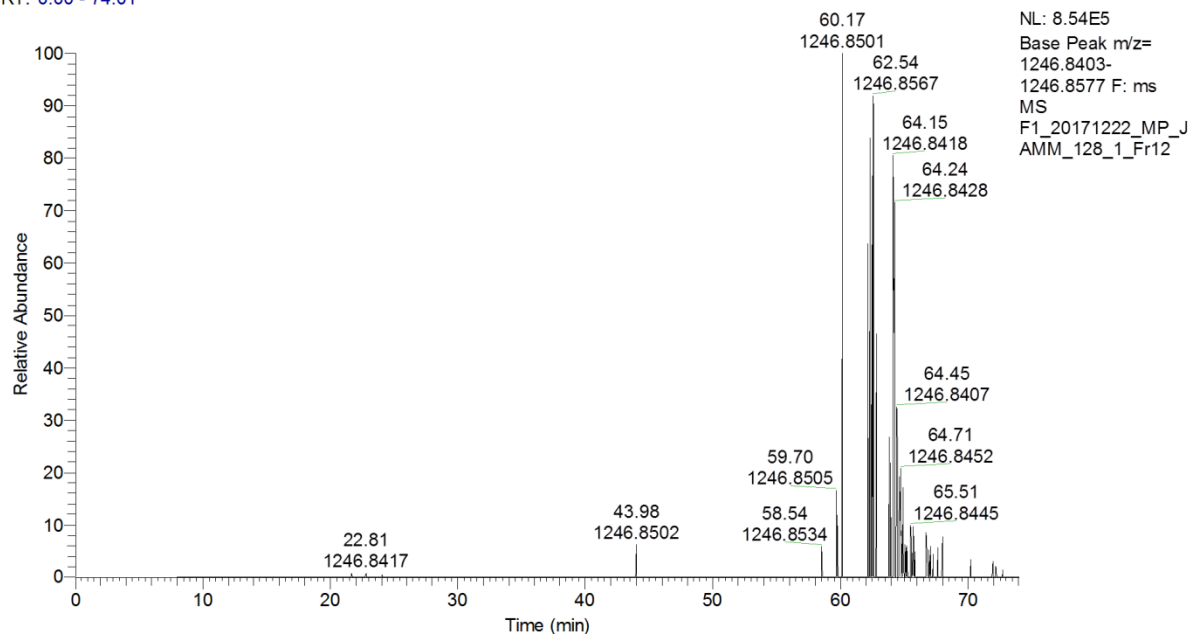


Peptide-Spektrum-Match des EThcD MS/MS Spektrums des pyrophosphorylierten Peptides
ESEDKPEIEDVGSDEEEEEKDGDGK, inklusive identifizierter Fragmentationen nach Datenbanksuche
mittels Sequest und *ptmRS*.



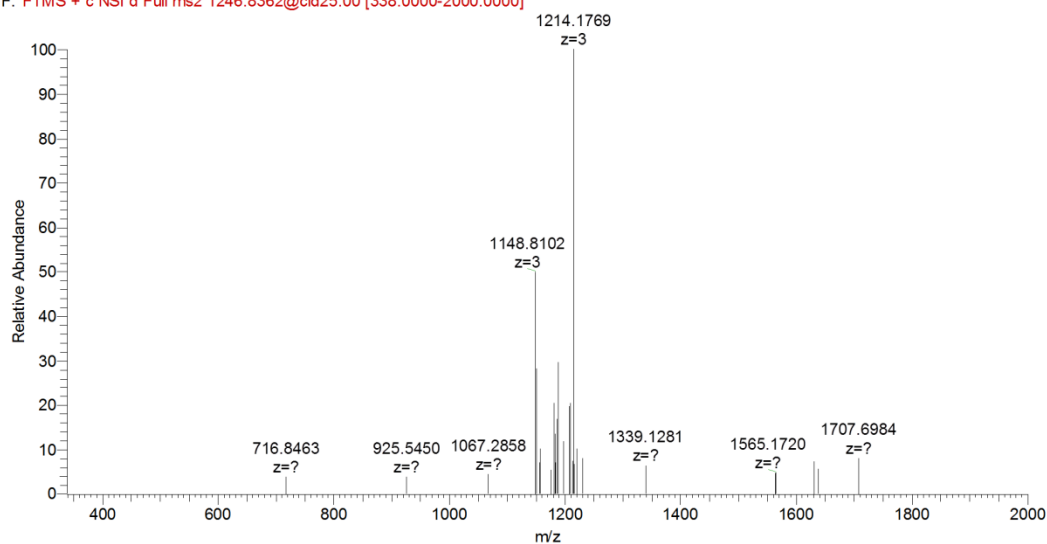
Totalionenstrom (TIC) einer Fraktion, welche die Pyrophosphopeptide KPATPAEDDEDDDED-
LFGppSDNEEEDKEAAQLR und CGSGPVHISGQHLVAVEEDAepSEDEEEEDVK enthielten.

RT: 0.00 - 74.01



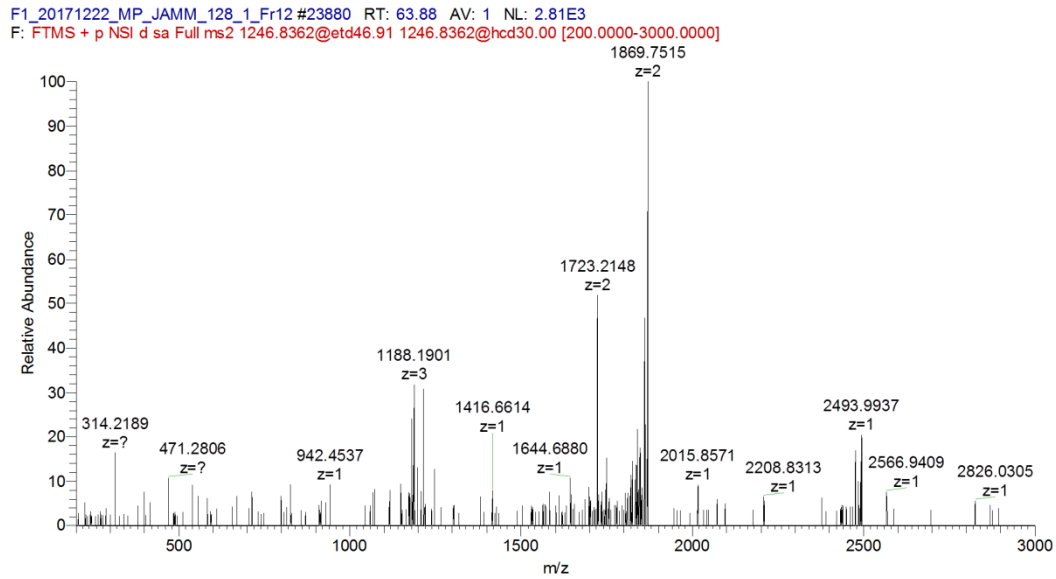
Extrahiertes Ionenchromatogramm (XIC) m/z 1246,836 des Pyrophosphopeptides KPATPAEDDEDDDEDLFGppSDNEEEDKEAAQLR.

F1_20171222_MP_JAMM_128_1_Fr12 #23878 RT: 63.87 AV: 1 NL: 5.36E4
F: FTMS + c NSI d Full ms2 1246.8362@cid25.00 [338.0000-2000.0000]



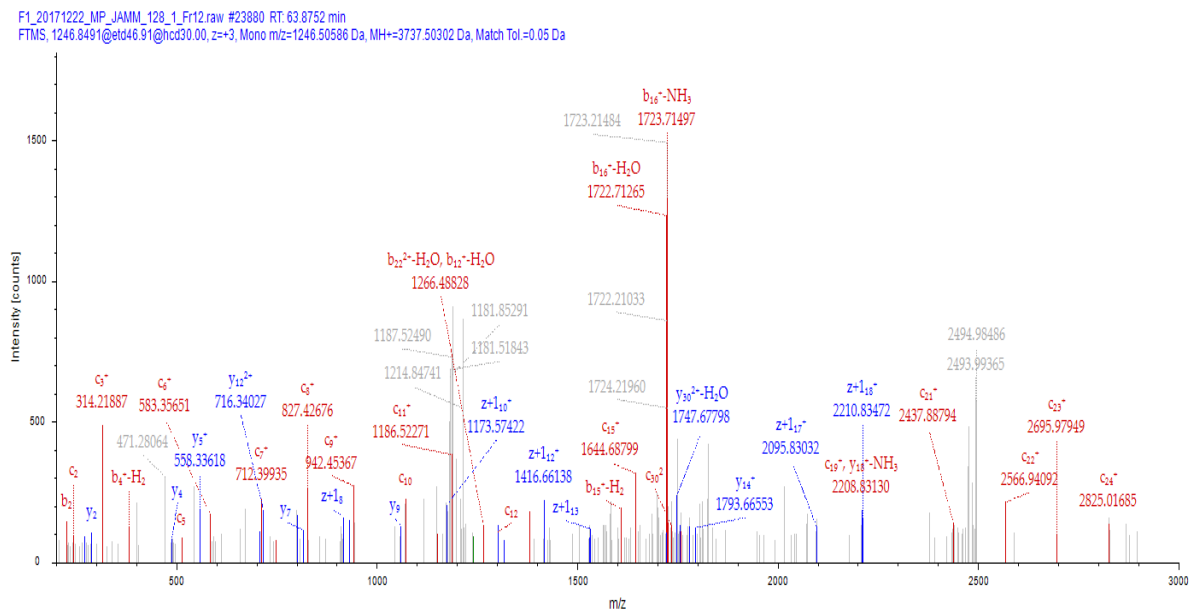
CID MS/MS Spektrum des pyrophosphorylierten Peptides

KPATPAEDDEDDDEDLFGppSDNEEEDKEAAQLR (Retentionszeit: 63,87 min; Scannummer: 23878).



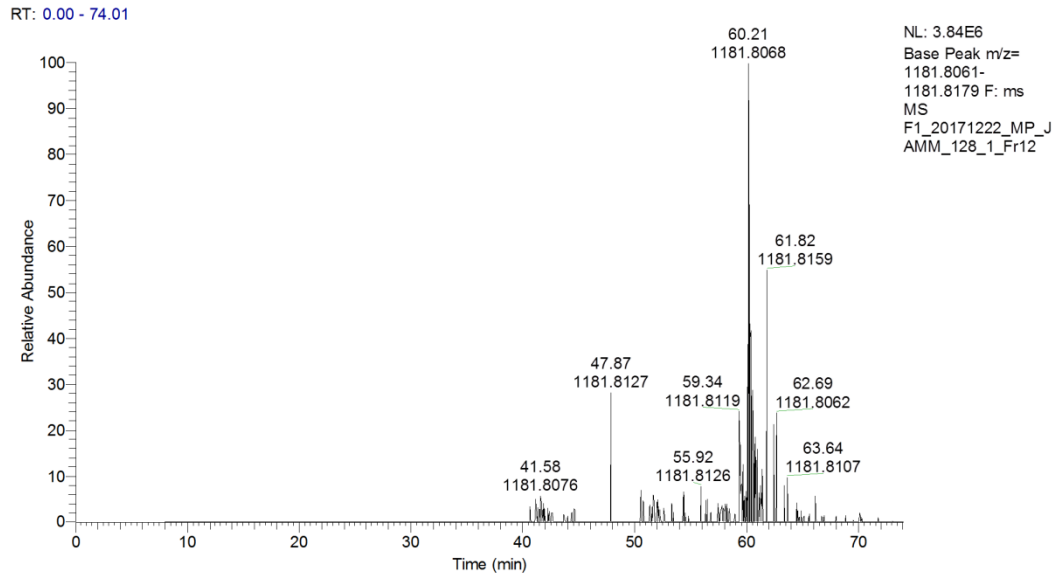
Getriggertes EThcD MS/MS Spektrum des pyrophosphorylierten Peptides

KPATPAEDDEDDDEDLFGppSDNEEDKEAAQLR (Retentionszeit: 63,88 min; Scannummer: 23880).

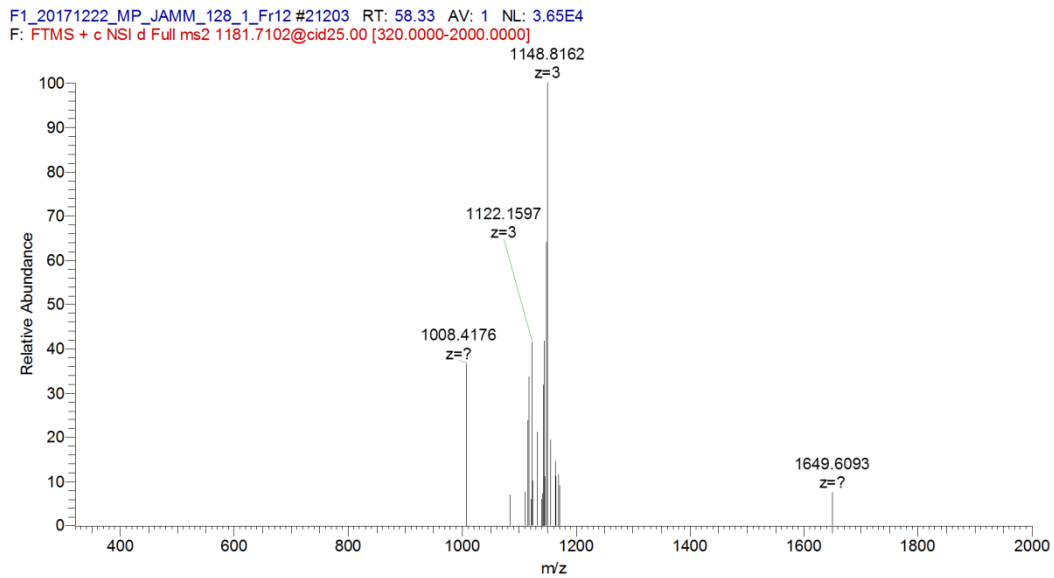


Peptide-Spektrum-Match des EThcD MS/MS Spektrums des pyrophosphorylierten Peptides

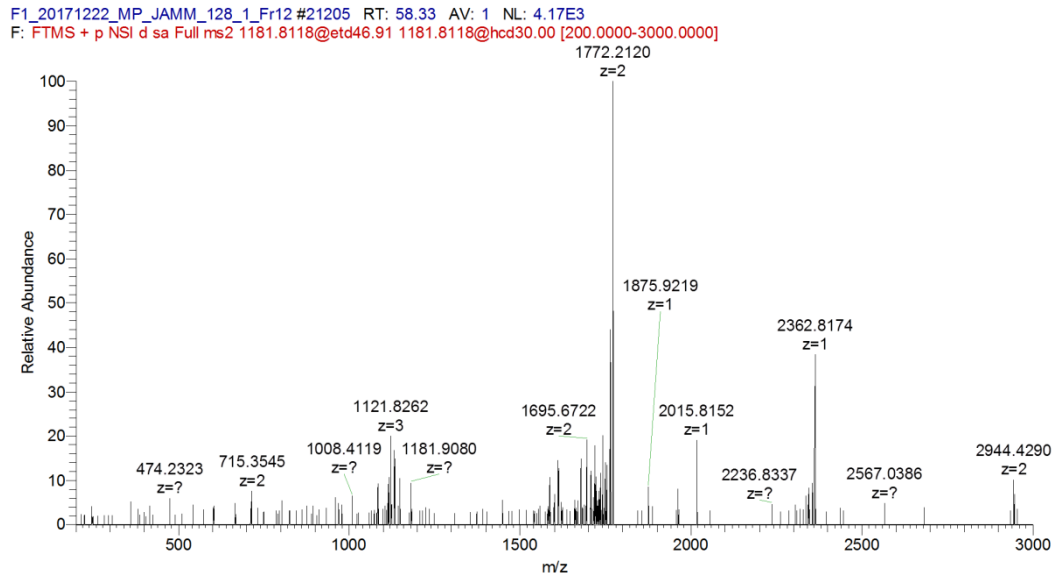
KPATPAEDDEDDDEDLFGppSDNEEDKEAAQLR, inklusive identifizierter Fragmentationen nach Datenbanksuche mittels Sequest und *ptm*RS.



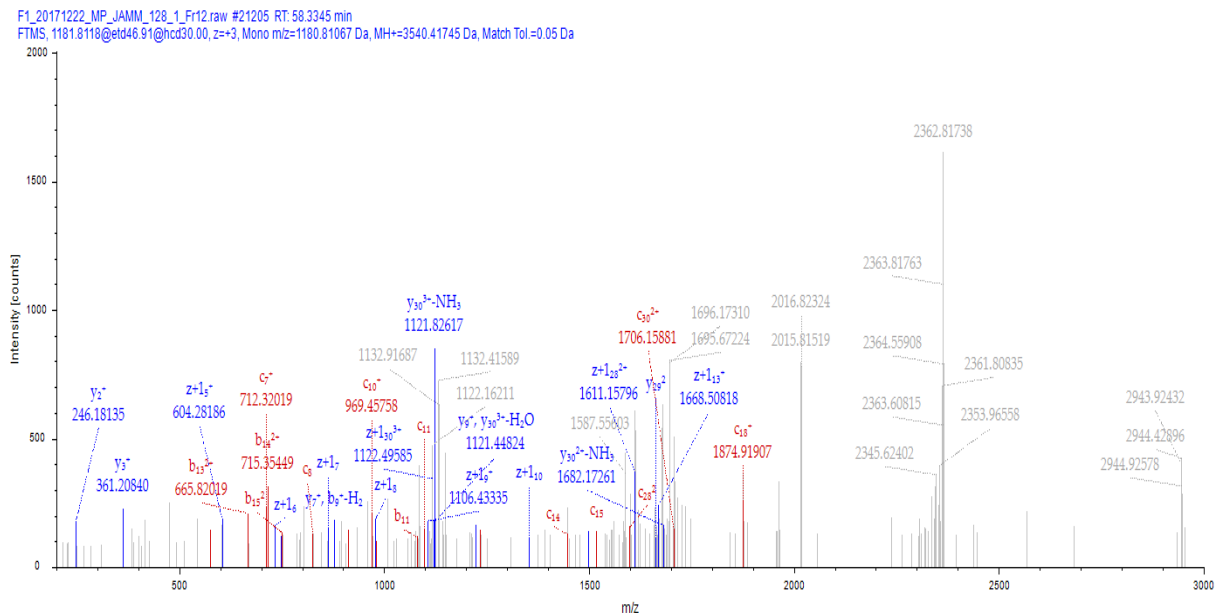
Extrahiertes Ionenchromatogramm (XIC) m/z 1181,812 des Pyrophosphopeptides CGSGPVHISGQHLVAVEEDAEppSEDEEEEDVK.



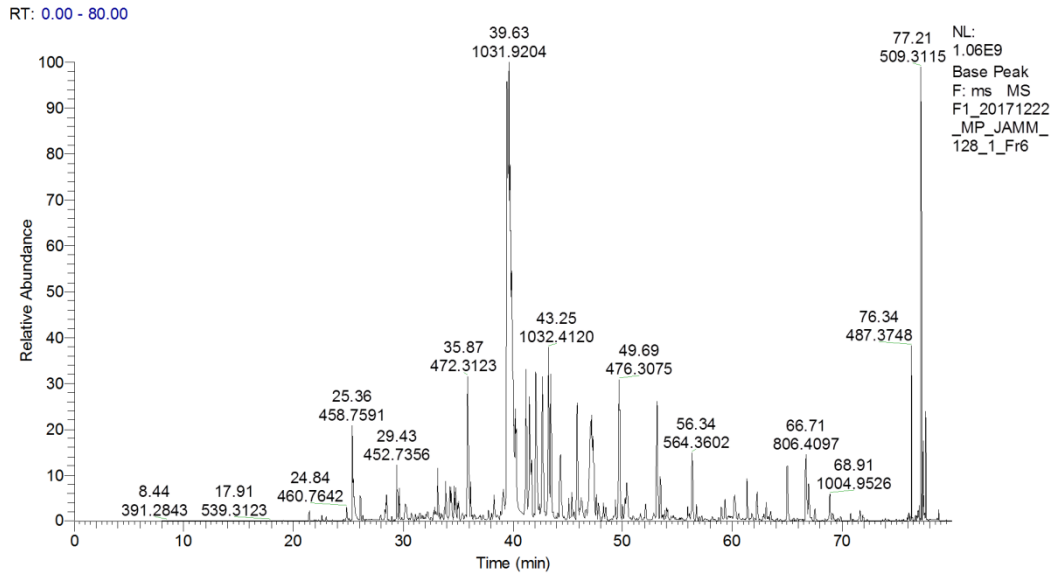
CID MS/MS Spektrum des pyrophosphorylierten Peptides CGSGPVHISGQHLVAVEEDAEppSEDEEEEDVK (Retentionszeit: 58,33 min; Scannummer: 21203).



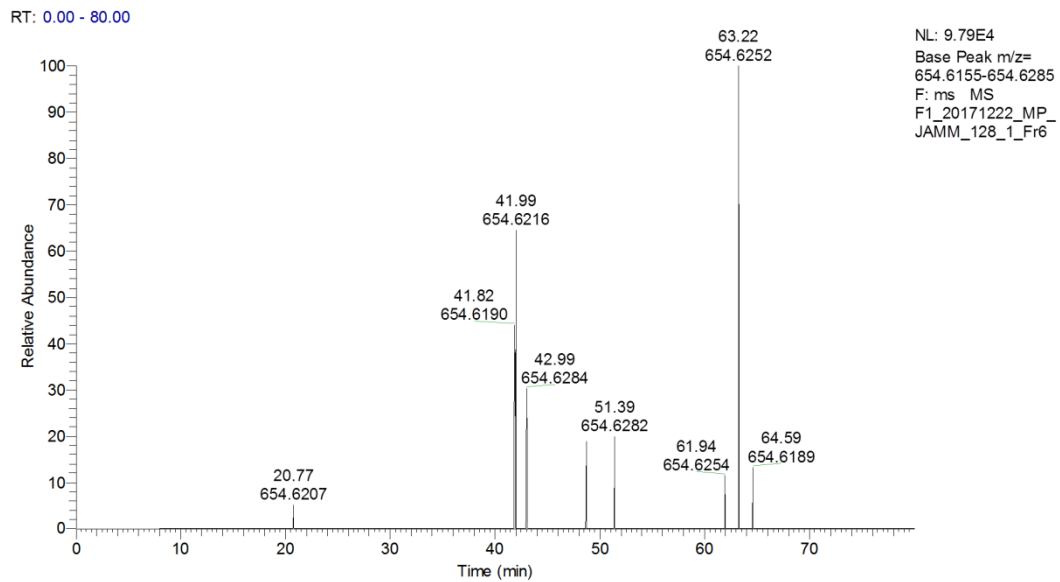
Getriggertes EThcD MS/MS Spektrum des pyrophosphorylierten Peptides
CGSGPVHISGQHLVAVEEDAEppSEDEEEEDVK (Retentionszeit: 58,33 min; Scannummer: 21205).



Peptide-Spektrum-Match des EThcD MS/MS Spektrums des pyrophosphorylierten Peptides
CGSGPVHISGQHLVAVEEDAEppSEDEEEEDVK, inklusive identifizierter Fragmentationen nach
Datenbanksuche mittels Sequest und *ptm*RS.

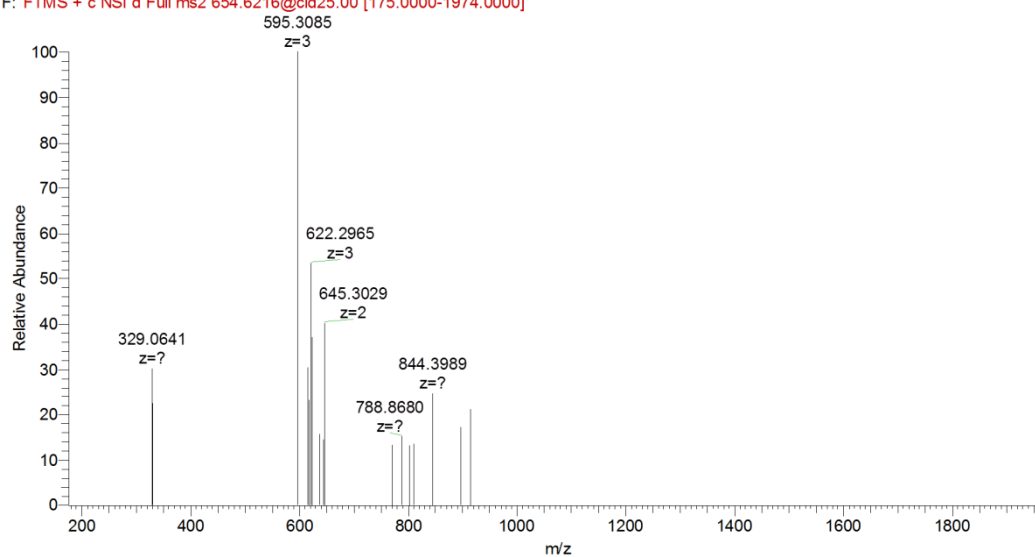


Totalionenstrom (TIC) einer Fraktion, welche das Pyrophosphopeptid VMLGEppTNPADSKPGTIR enthielt.



Extrahiertes Ionenchromatogramm (XIC) m/z 654,621 des Pyrophosphopeptides VMLGEppTNPADSKPGTIR.

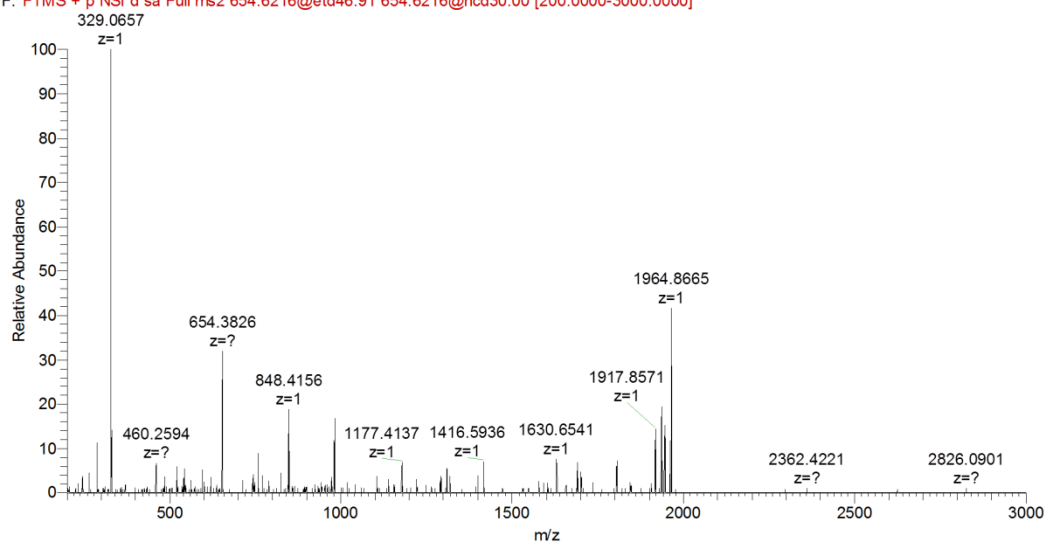
F1_20171222_MP_JAMM_128_1_Fr6 #13842 RT: 42.04 AV: 1 NL: 1.93E4
F: FTMS + c NSI d Full ms2 654.6216@cid25.00 [175.0000-1974.0000]



CID MS/MS Spektrum des pyrophosphorylierten Peptides

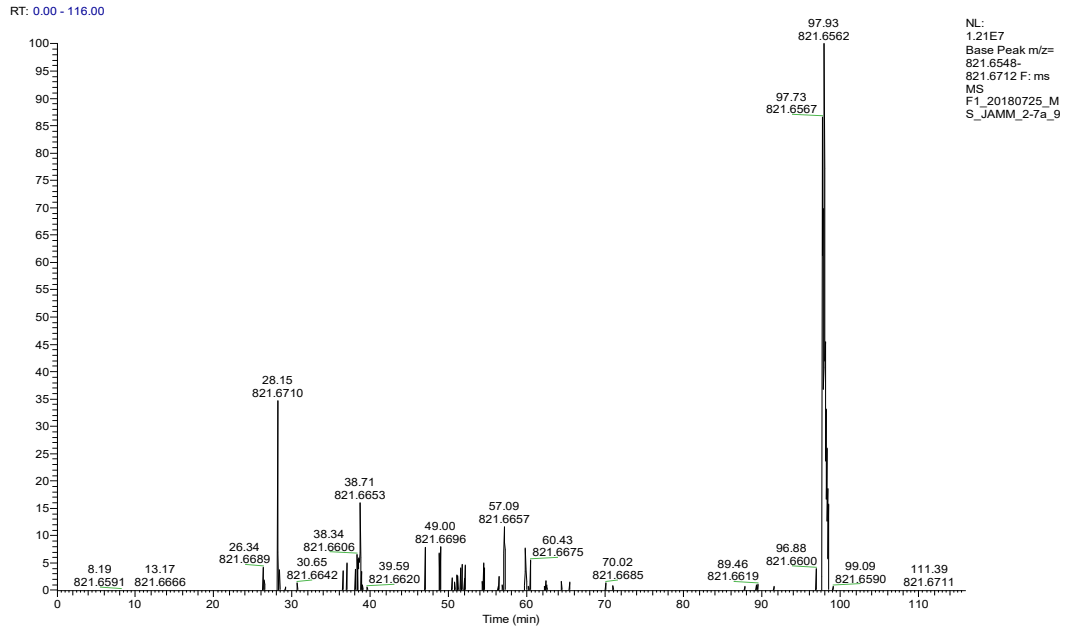
VMLGEppTNPADSKPGTIR (Retentionszeit: 42,04 min; Scannummer: 13842).

F1_20171222_MP_JAMM_128_1_Fr6 #13844 RT: 42.05 AV: 1 NL: 4.81E3
F: FTMS + p NSI d sa Full ms2 654.6216@etd46.91 654.6216@hcd30.00 [200.0000-3000.0000]

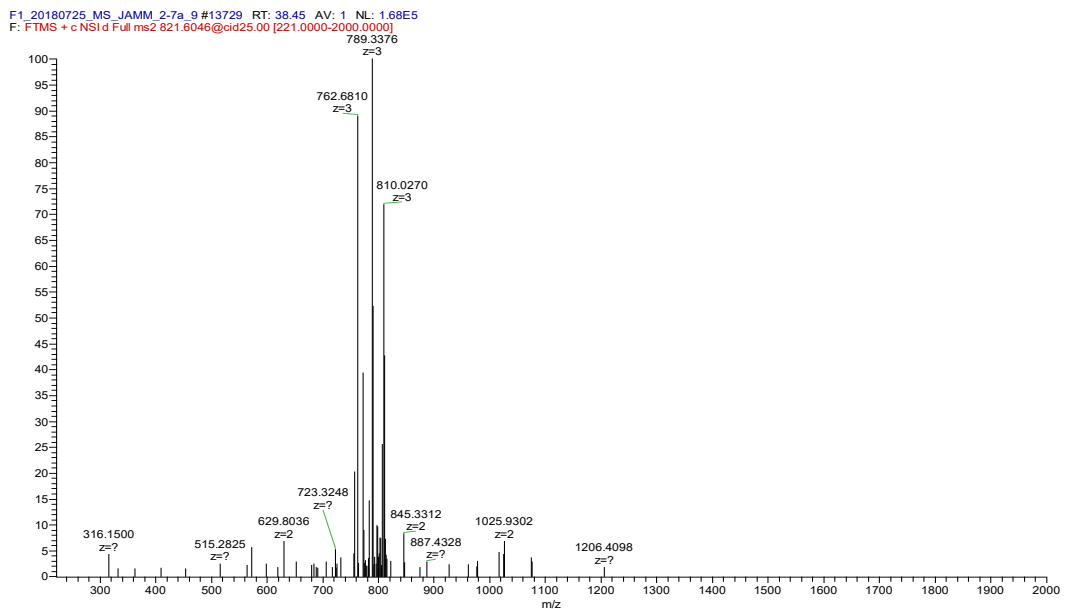


Getriggertes EThcD MS/MS Spektrum des pyrophosphorylierten Peptides

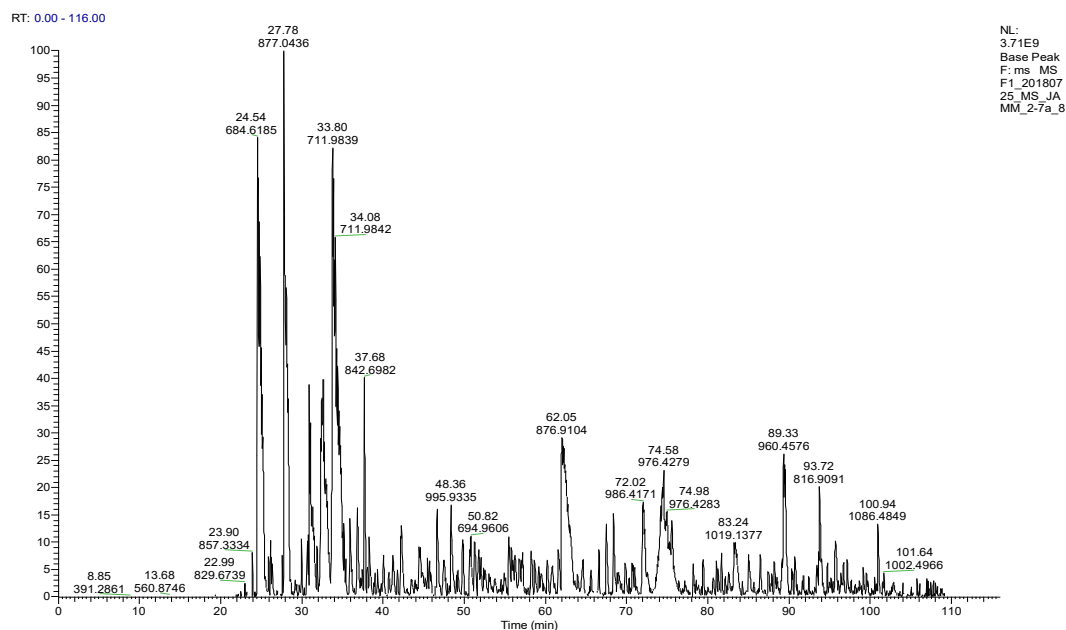
VMLGEppTNPADSKPGTIR (Retentionszeit: 42,05 min; Scannummer: 13844).



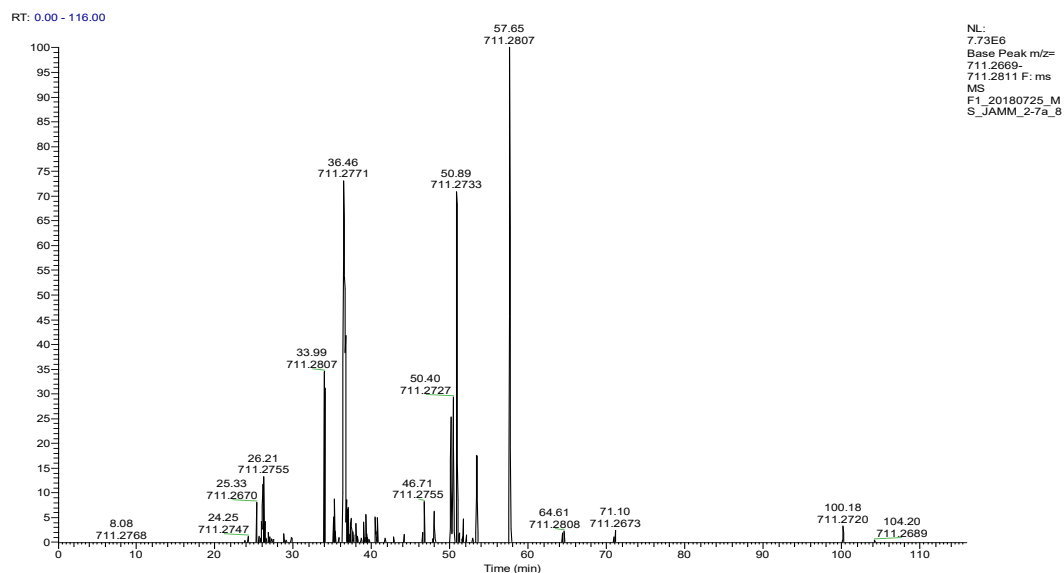
Extrahiertes Ionenchromatogramm (XIC) m/z 821,605 des Pyrophosphopeptides KGAGDGppSDEEVDGKADGAELKPAE.



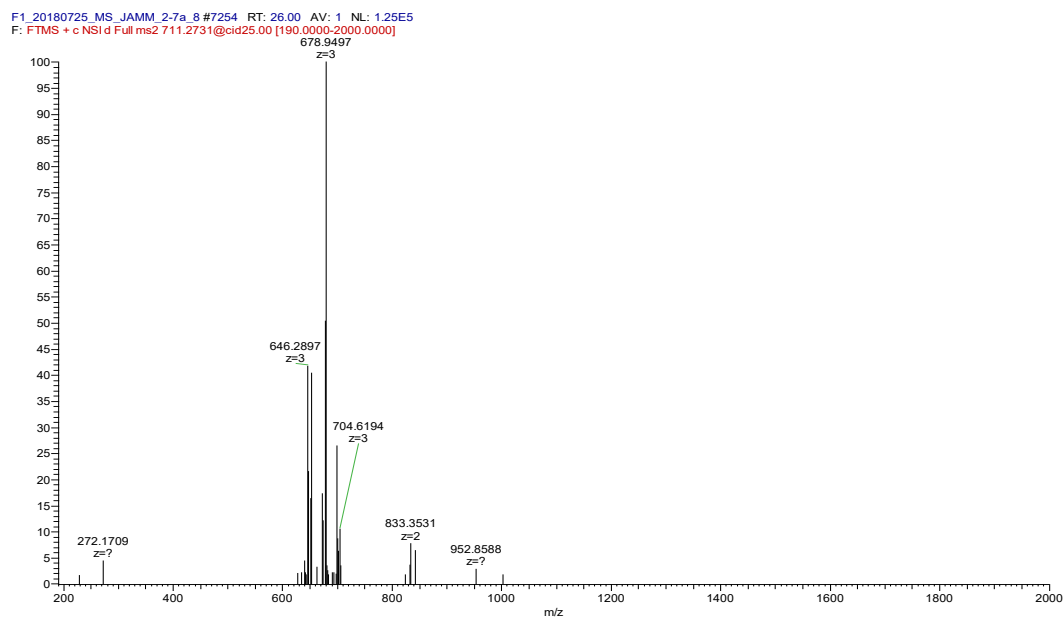
CID MS/MS Spektrum des pyrophosphorylierten Peptides KGAGDGppSDEEVDGKADGAELKPAE (Retentionszeit: 38,45 min; Scannummer: 13729).



Totalionenstrom (TIC) einer Fraktion, welche die Pyrophosphopeptide IDASKNEEDEGHSNppSSPR und IDASKNEEDEGHSNSppSSPR enthält.

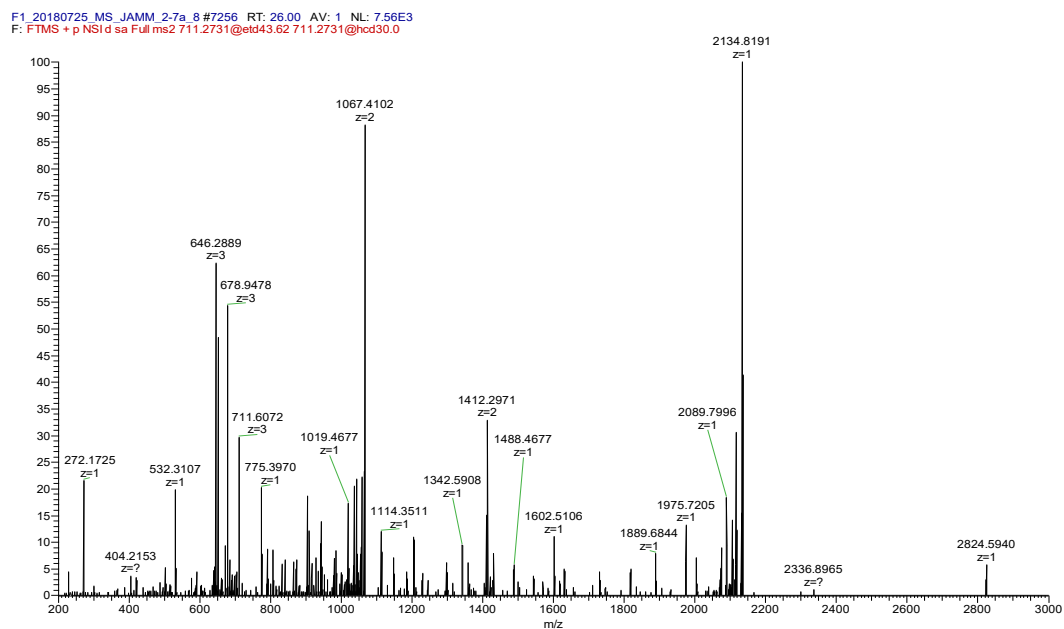


Extrahiertes Ionenchromatogramm (XIC) m/z 711,279 der Pyrophosphopeptide IDASKNEEDEGHSNppSSPR und IDASKNEEDEGHSNSppSSPR.



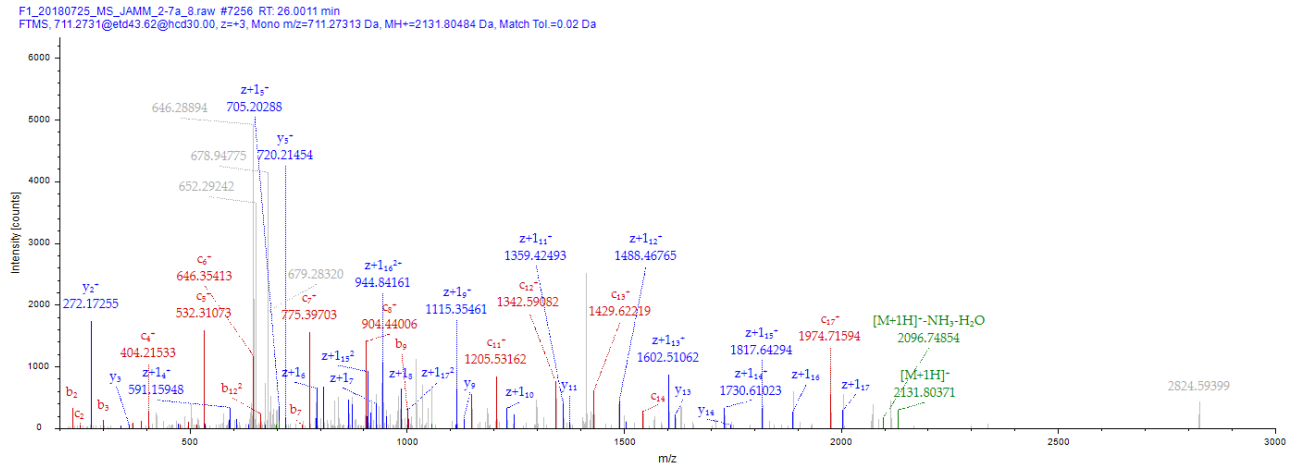
CID MS/MS Spektrum des pyrophosphorylierten Peptides

IDASKNEEDEGHSNpSSPR (Retentionszeit: 26,00 min; Scannummer: 7254).

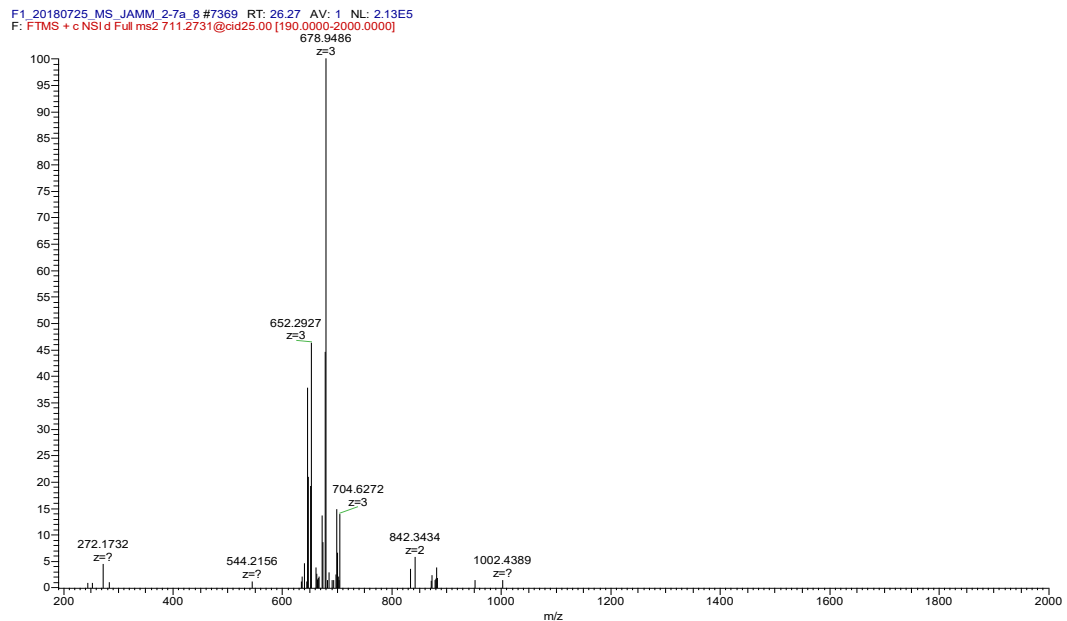


Getriggertes EThcD MS/MS Spektrum des pyrophosphorylierten Peptides

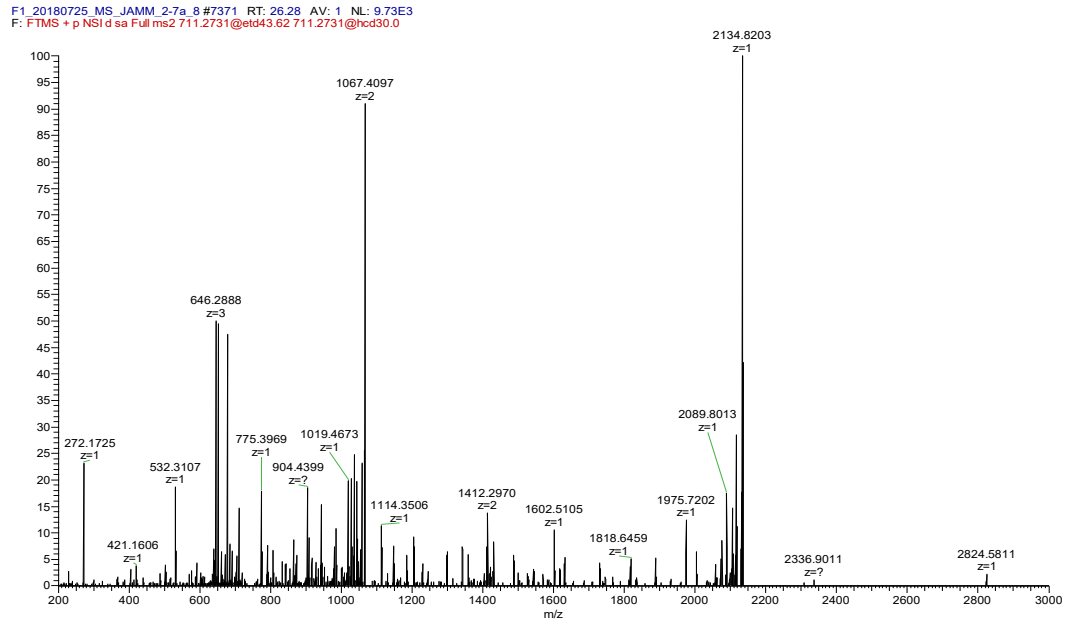
IDASKNEEDEGHSNpSSPR (Retentionszeit: 26,00 min; Scannummer: 7256).



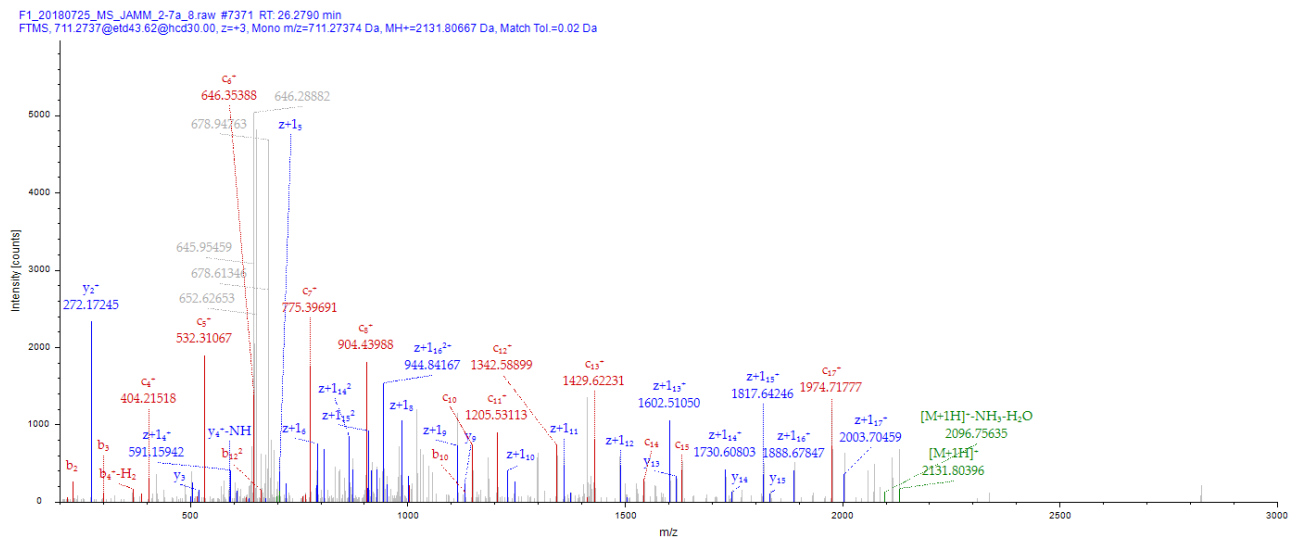
Peptide-Spektrum-Match des EThcD MS/MS Spektrums des pyrophosphorylierten Peptides IDASKNEEDEGHSNppSSPR, inklusive identifizierter Fragmentionen nach Datenbanksuche mittels Sequest.



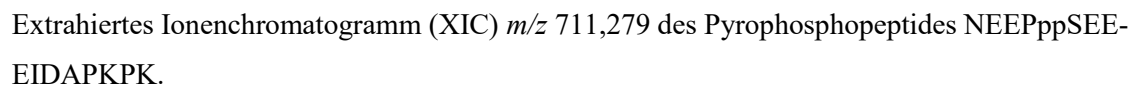
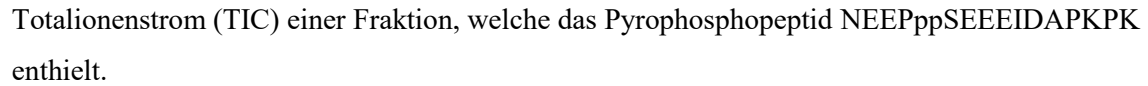
CID MS/MS Spektrum des pyrophosphorylierten Peptides IDASKNEEDEGHSNSppSSPR (Retentionszeit: 26,27 min; Scannummer: 7369).



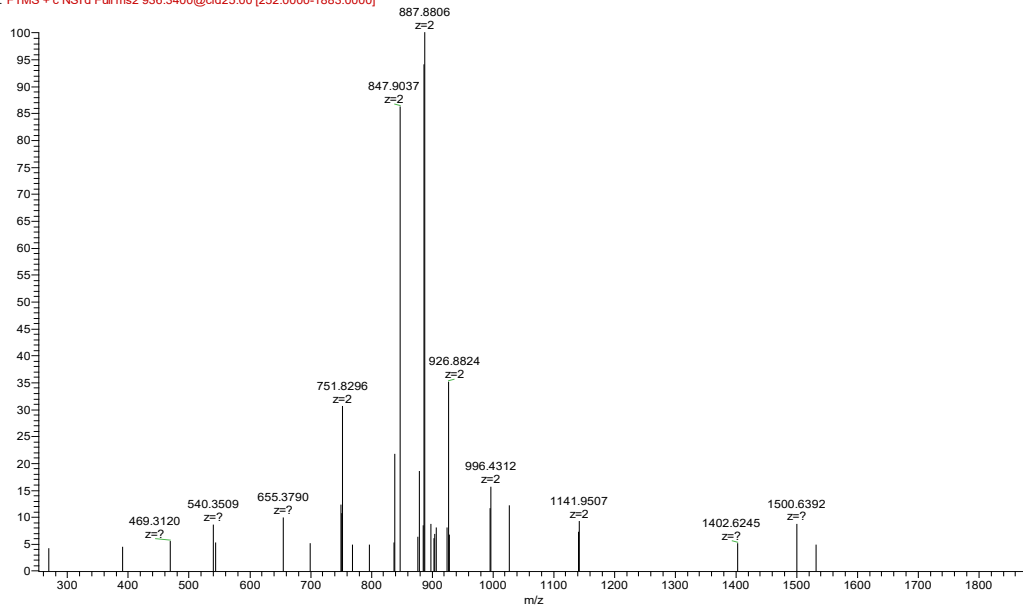
Getriggertes EThcD MS/MS Spektrum des pyrophosphorylierten Peptides
IDASKNEEDEGHNSpSPR (Retentionszeit: 26,28 min; Scannummer: 7371).



Peptide-Spektrum-Match des EThcD MS/MS Spektrums des pyrophosphorylierten Peptides
IDASKNEEDEGHNSpSPR, inklusive identifizierter Fragmentionen nach Datenbanksuche mittels
Sequest.

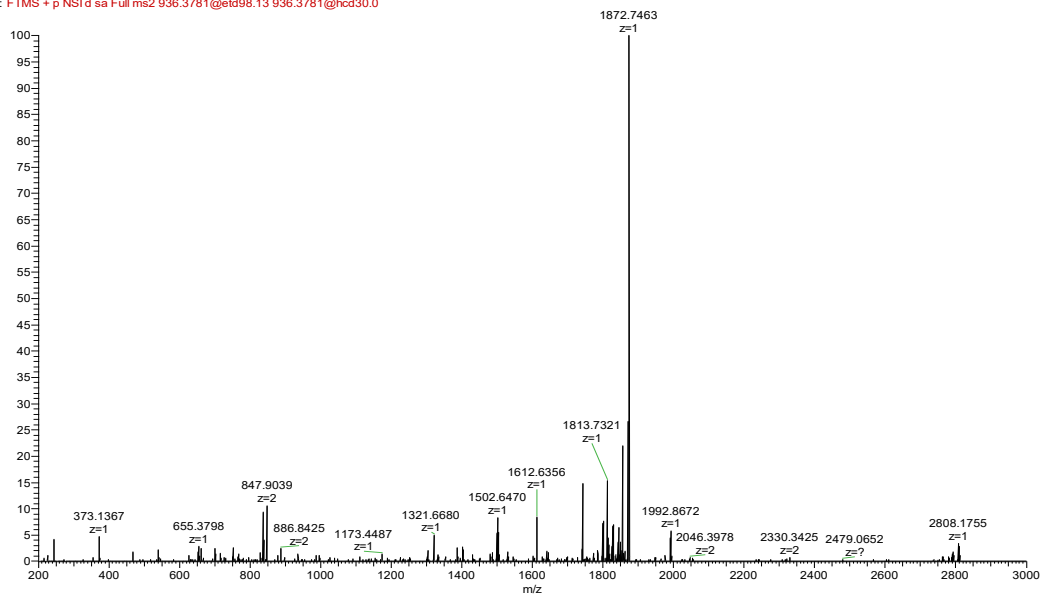


F1 20180725_MS_JAMM_2-7a_9 #19428 RT: 48.40 AV: 1 NL: 1.35E5
F: FTMS + c NSI d Full ms2 936.3400@cid25.00 [252.0000-1883.0000]

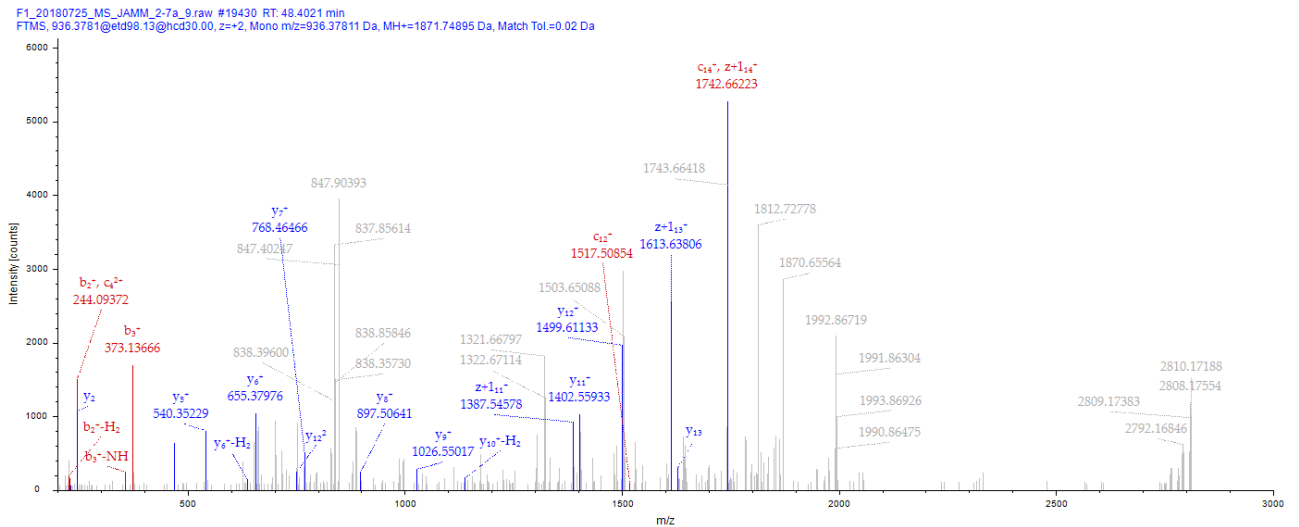


CID MS/MS Spektrum des pyrophosphorylierten Peptides NEEppSEEEIDAPKPK (Retentionszeit: 48,40 min; Scannummer: 19428).

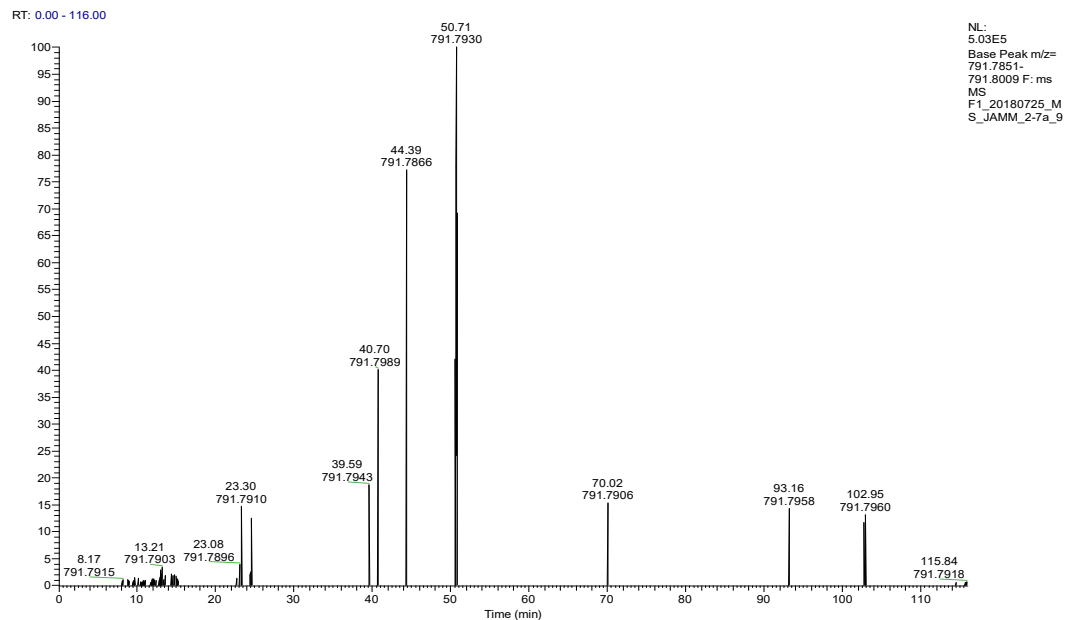
F1 20180725_MS_JAMM_2-7a_9 #19430 RT: 48.40 AV: 1 NL: 3.55E4
F: FTMS + p NSI d sa Full ms2 936.3781@etd98.13 936.3781@hcd30.0



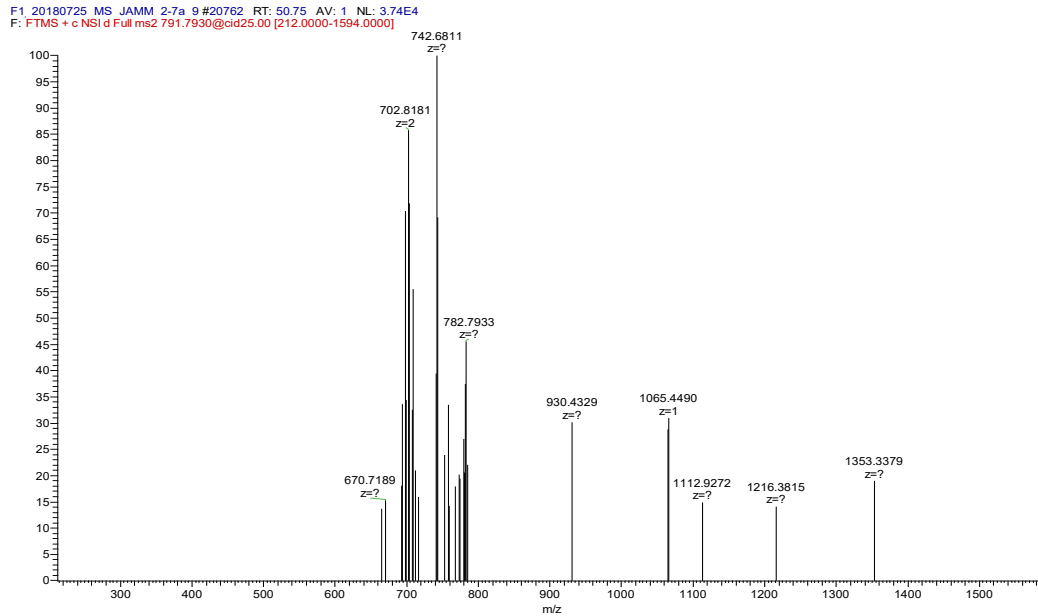
Getriggertes EThcD MS/MS Spektrum des pyrophosphorylierten Peptides NEEppSEEEIDAPKPK (Retentionszeit: 48,40 min; Scannummer: 19430).



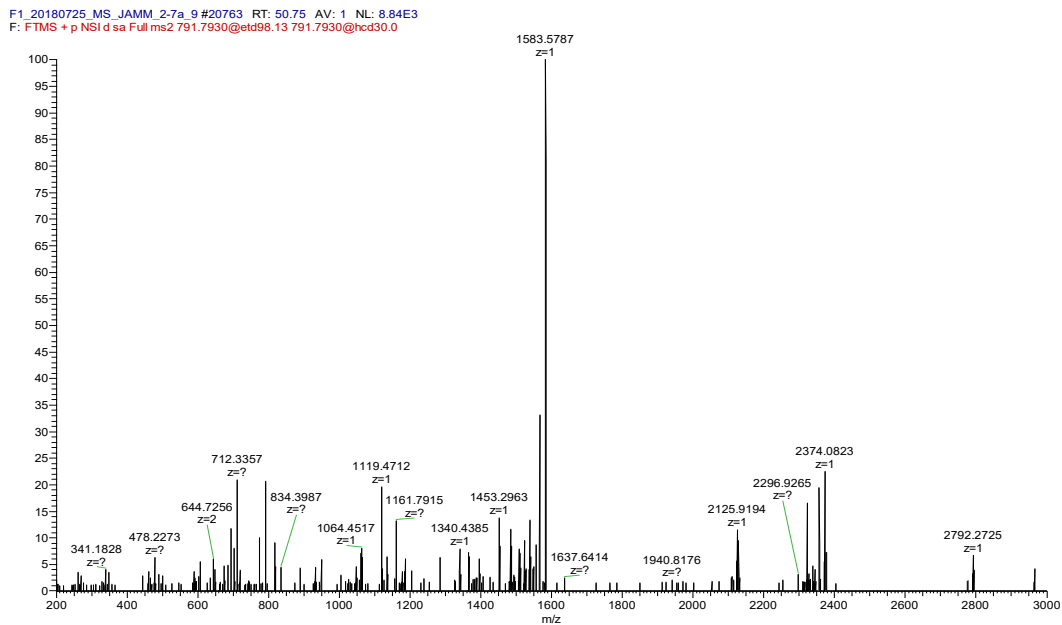
Peptide-Spektrum-Match des EThcD MS/MS Spektrums des pyrophosphorylierten Peptides NEEppp-SEEEIDAPKPK, inklusive identifizierter Fragmentationen nach Datenbanksuche mittels Sequest.



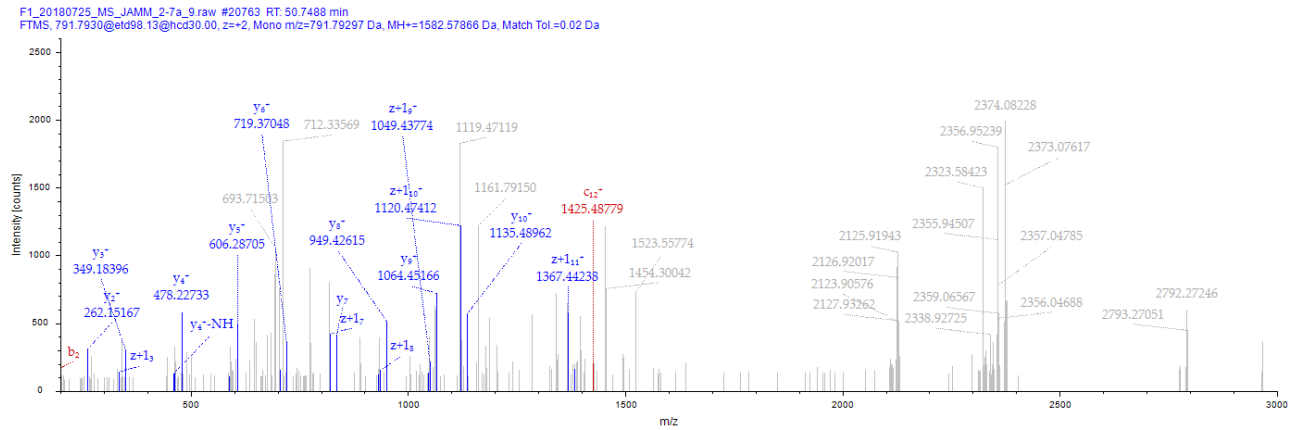
Extrahiertes Ionenchromatogramm (XIC) m/z 711,279 des Pyrophosphopeptides SlppSADDD-LQESSR.



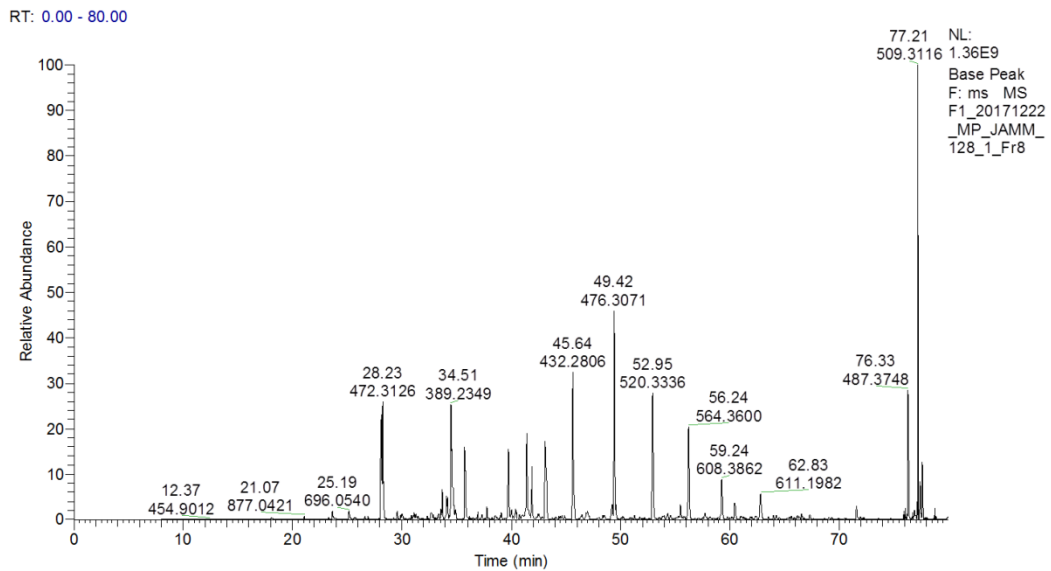
CID MS/MS Spektrum des pyrophosphorylierten Peptides SippSADDDLQESSR (Retentionszeit: 50,75 min; Scannummer: 20762).



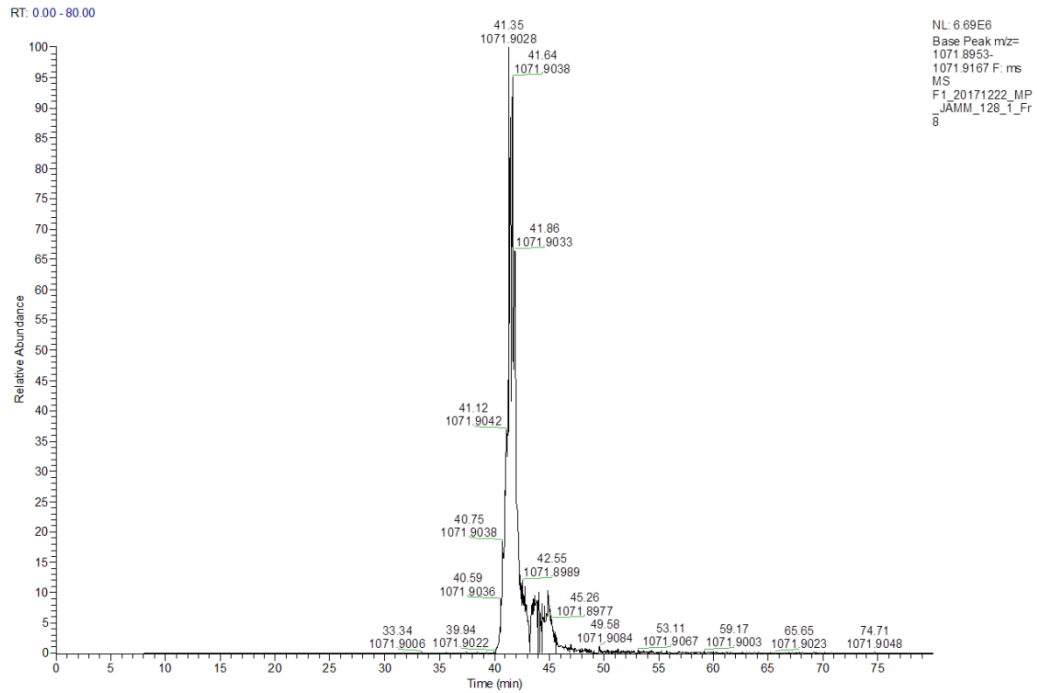
Getriggertes EThcD MS/MS Spektrum des pyrophosphorylierten Peptides SippSADDDLQESSR (Retentionszeit: 50,75 min; Scannummer: 20763).



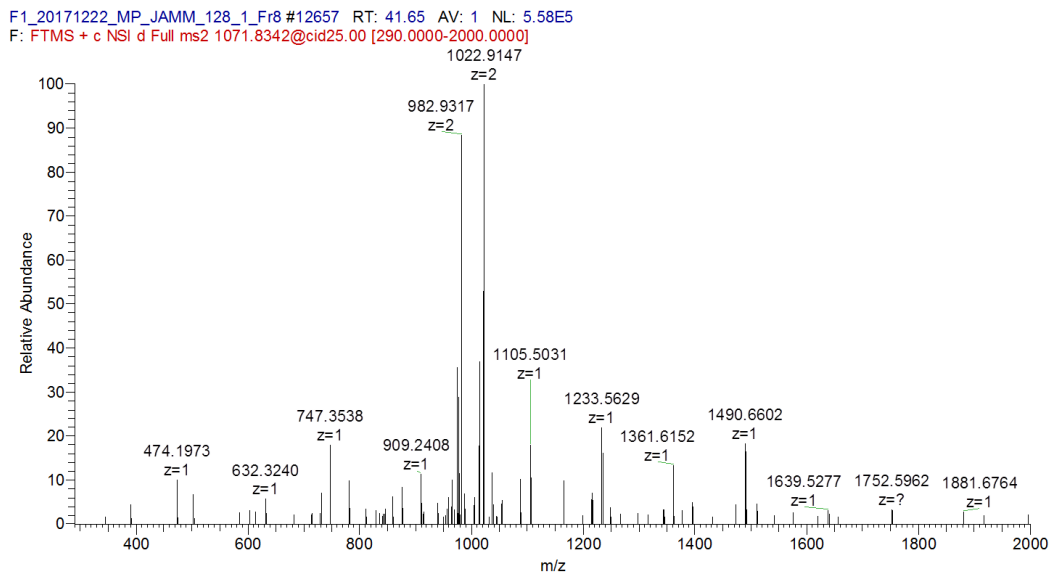
Peptide-Spektrum-Match des EThcD MS/MS Spektrums des pyrophosphorylierten Peptides
SlppSADDDLQESSR, inklusive identifizierter Fragmentationen nach Datenbanksuche mittels Sequest.



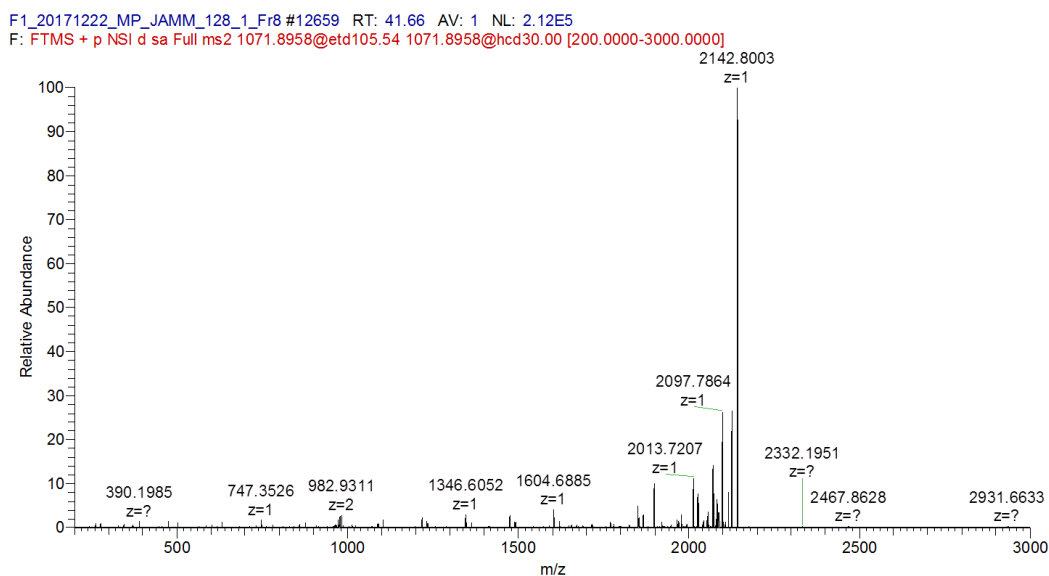
Totalionenstrom (TIC) einer Fraktion, welche das Pyrophosphopeptid FQppSEEQQQTEDELQDK
enthält.



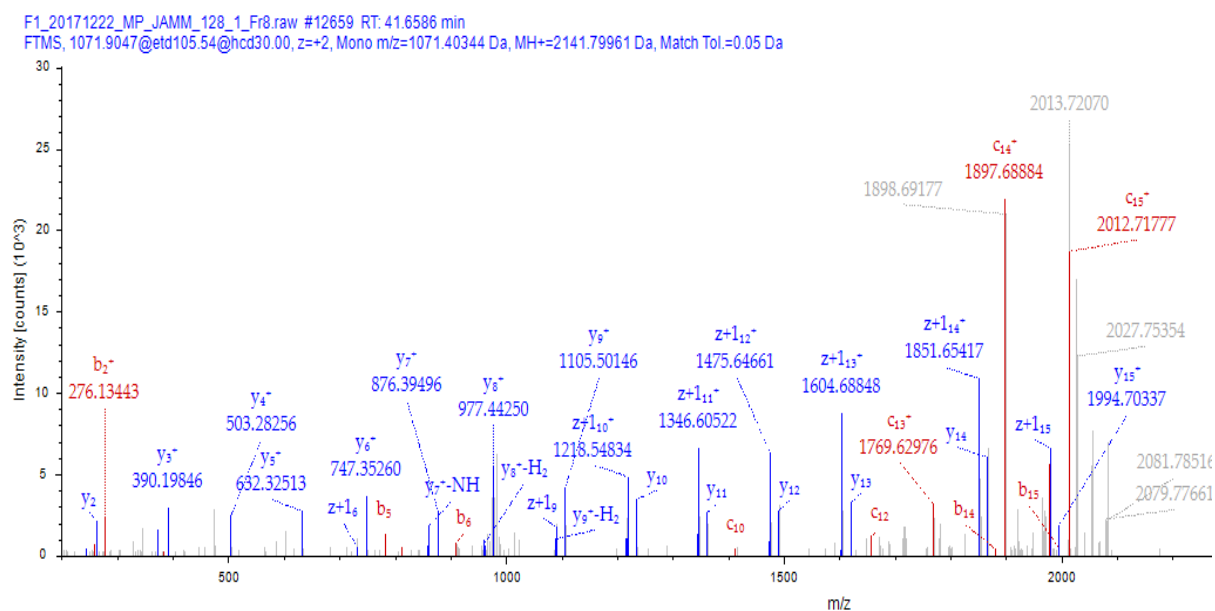
Extrahiertes Ionenchromatogramm (XIC) m/z 1071,904 des Pyrophosphopeptides FQppSEEQQQTEDELQDK.



CID MS/MS Spektrum des pyrophosphorylierten Peptides FQppSEEQQQTEDELQDK (Retentionszeit: 41,65 min; Scannummer: 12657).



Getriggertes ETHcD MS/MS Spektrum des pyrophosphorylierten Peptides
FQppSEEQQQTEDELQDK (Retentionszeit: 41,66 min; Scannummer: 12659).



Peptide-Spektrum-Match des ETHcD MS/MS Spektrums des pyrophosphorylierten Peptides
FQppSEEQQQTEDELQDK, inklusive identifizierter Fragmentionen nach Datenbanksuche mittels
Sequest und *ptmRS*.

Literaturbekannte Phosphorylierungsstellen in HEK 293

Protein	Pyrophosphorylierung	Phosphorylierung	Zellorganell
Dual spezifische Proteinkinase	S341	S341	Nucleus
MICOS Komplex Untereinheit	S50	Y49; S50 ^{153, 311, 334, 335}	Nucleus, Mitochondrium
Elongationsfaktor 1-delta	S162	S162 ^{16, 311, 334}	Nucleus
Nukleophosmin	S125	S125 ^{153, 311, 334}	Nucleus, Zytoskelett
Heatshockprotein HSP 90-alpha	S263	S263 ^{16, 153}	Nucleus
Nukleosiddiphosphatkinase A	T94	T94	Nucleus
Mikrotubuli-assoziiertes Protein Tau	S713	S713 ^{153, 311}	Nucleus
Nucleolar RNA Helikase 2	S121	S121 ^{153, 334, 335}	Nucleus
Heterogenes Nuclearrribonucleoprotein D0	S82 & S83	S80; S82; S83 ^{153, 334, 336}	Nucleus
Myosin- 9	S1943	S1943 ^{16, 311}	Zytoskelett
Negativer Elongationsfaktor E	S115	S113; S115 ^{153, 334-336}	Nucleus

Publikationen, Konferenzbeiträge & Preise

Publikationen:

Penkert, M., Yates, L. M., Schumann, M., Perlman, D., Fiedler, D., Krause, E. Unambiguous Identification of Serine and Threonine Pyrophosphorylation Using Neutral-Loss-Triggered Electron-Transfer/Higher-Energy Collision Dissociation. *Anal. Chem.* **89**, 3672-3680, DOI: 10.1021/acs.anal-chem.6b05095 (2017).

Bertran-Vicente, J., Penkert, M., Nieto-Garcia, O., Jeckelmann, J.-M., Schmieder, P., Krause, E., Hackenberger, C. P. R. Chemoselective synthesis and analysis of naturally occurring phosphorylated cysteine peptides. *Nature Commun.* **7**, 12703, DOI: 10.1038/ncomms12703 (2016).

Hauser, A., Penkert, M., Hackenberger, C.P.R. Chemical Approaches to Investigate Labile Peptide and Protein Phosphorylation. (Review) *Acc. Chem. Res.* **50**, 1883-1893, DOI: 10.1021/acs.accounts.7b00170 (2017).

Marmelstein, A.M., Morgan, J.A.M., Penkert, M., Rogerson, D.T., Chin, J.W., Krause, E., Fiedler, D. Pyrophosphorylation via selective phosphoprotein derivatization. *Chem. Sci.*, DOI: 10.1039/C8SC01233D (2018).

Penkert, M., Krause, E. Tandem-Massenspektrometrie: Die Analyse von Proteinmodifizierungen. *GIT-Labor Zeitschrift*, **5**, 28-31 (2016).

Eingereicht oder in Vorbereitung:

Penkert, M., Hauser, A., Harmel, R., Fiedler, D., Hackenberger, C.P.R., Krause, E. Electron Transfer/Higher Energy Collisional Dissociation of Doubly Charged Peptide Ions: Identification of Labile Protein Phosphorylations. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, eingereicht zur Veröffentlichung

Kasper, M.-A., Glanz, M., Schwagerus, S., Stengl, A., Penkert, M., Klenk, S., Sauer, T., Schumacher, D., Helma-Smets, J., Krause, E., Cardoso, M. C., Leonhardt, H., Hackenberger, C.P.R. Cysteine-selective phosphoramidate electrophiles for modular protein bioconjugations. *Angew.Chem. Int. Ed.*, eingereicht zur Veröffentlichung

Bhownick, D., Penkert, M., Krause, E., Hackenberger, C. P. R. in Vorbereitung

Vorträge:

Penkert, M., Yates, L. M., Schümann, M., Perlman, D., Fiedler, D., Krause E. “Neutral loss-triggered EThcD mass spectrometry identifies protein pyrophosphorylation *in vivo*”, 50. Jahrestagung der DGMS 2017, Kiel, 07.08.2017.

Posterpräsentationen:

Penkert, M., Bertran-Vicente, J., Schümann, M., Hackenberger, C.P.R., Krause, E. „Analysis of phosphorylated lysine peptides by ETD mass spectrometry”, 49. Jahrestagung der DGMS 2016, Hamburg, 28.02.-02.03.2016.

Penkert, M., Yates, L. M., Schümann, M., Perlman, D., Fiedler, D., Krause, E. “Neutral loss-triggered EThcD mass spectrometry identifies protein pyrophosphorylation *in vivo*”, GDCh Wissenschaftsforum Chemie 2017-Jubiläumskongress -150 Jahre GDCh, Berlin, 10.09.-14.09.2017.

Penkert, M., Hauser, A., Harmel, R., Fiedler, D., Hackenberger, C.P.R., Krause, E. „Electron transfer/higher energy collision dissociation of doubly charged labile phosphorylated peptides”, EMSC (European Mass Spectrometry Conference) 2018, Saarbrücken, 11.03.-15.03.2018.

Hauser, A., Bhowmick, D., Bertran-Vicente, J., Penkert, M., Krause, E., Hackenberger, C.P.R. „Chemosensitive Tools to Decipher Uncommon Phosphorylations“, GDCh Wissenschaftsforum Chemie 2017-Jubiläumskongress -150 Jahre GDCh, Berlin, 10.09.-14.09.2017.

Preise:

1. Posterpreis der Fachgruppe Analytische Chemie, GDCh Wissenschaftsforum Chemie 2017-Jubiläumskongress -150 Jahre GDCh

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand im Zeitraum von Juni 2015 bis Mai 2018 am Leibniz-Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie (FMP) in Berlin.

Da eine wissenschaftliche Arbeit nie das Werk eines einzelnen ist, möchte ich die folgenden Zeilen dazu nutzen, um denjenigen Menschen zu danken, die direkt oder indirekt einen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit geleistet haben.

An erster Stelle möchte ich meinen Betreuern **Dr. Eberhard Krause** und **Prof. Dr. Christian Hackenberger** für die Überlassung dieses sehr interessanten Themas danken. Mein besonderer Dank gilt **Dr. Eberhard Krause** für die immerwährende Gesprächsbereitschaft, das große Vertrauen in meine Fähigkeiten, welches mir von Beginn an entgegengebracht wurde und die gewährten Freiheiten im Zuge dieser Arbeit. Außerdem danke ich ihm für die zahlreichen Diskussionen außerhalb des wissenschaftlichen Diskurses, welche nicht nur zur Erweiterung des Horizontes beigetragen, sondern auch den nötigen Freiraum für die Entwicklung neuer Ideen innerhalb des Promotionsthemas eröffneten. Das durch Herrn Dr. Krause maßgeblich beeinflusste, sehr angenehme Arbeitsklima innerhalb Gruppe hat ebenfalls erheblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herrn **Prof. Dr. Christian Hackenberger** möchte ich ebenfalls für die stete Diskussionsbereitschaft sowie die wertvollen Anregungen und Hilfestellungen danken. Ich habe es immer als ein Privileg empfunden und es hat mich mit Stolz erfüllt, ein Teil des von ihm geleiteten Arbeitskreises zu sein. Die interdisziplinär und interkulturell aufgestellte Arbeitsgruppe erlaubte es mir, vielfältige Einblicke in Fachgebiete außerhalb der Massenspektrometrie zu erhalten sowie unterschiedliche Herangehensweisen und Lösungsansätze kennenzulernen. Diese Eindrücke waren nicht nur für die Erweiterung des eigenen Kenntnisstandes von eminenter Bedeutung, sondern haben auch die Bedeutung der eigenen Forschung ins rechte Licht gerückt. Obwohl ein Großteil der Forschungsarbeiten außerhalb seiner Arbeitsgruppe durchgeführt wurde, ist es ihm stets gelungen, mir das Gefühl eines vollwertigen Mitgliedes seines Arbeitskreises zu vermitteln. Dieses produktive Arbeitsklima war essentiell für zahlreiche erfolgreiche Kooperationen.

Bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Massenspektrometrie bedanke ich mich für die freundliche Aufnahme, Zusammenarbeit und Unterstützung. Hervorheben möchte ich hierbei **Dr. Michael Schümann**, von dessen Erfahrungsschatz ich sehr profitiert habe und mit dessen Hilfe ich meine Kenntnisse über die Massenspektrometrie erweitern konnte. Der eigene Anspruch die ideale und leistungsfähigste Methode zur Klärung einer analytischen Fragestellung zu entwickeln und stets aufs Neue die technologischen Grenzen auszuloten, hat uns verbunden und maßgeblich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen.

Ein besonderes Dankeschön gilt Frau **Heike Stephanowitz** für die immerwährende Unterstützung bei der Implementierung diverser chromatographischer Techniken und Anreicherungsverfahren sowie die ausgesprochen angenehme Zusammenarbeit. Des Weiteren möchte ich **Ramona Birke** für die andauernde Unterstützung und meiner Mitdotorandin **Annika Manns** für die vielen anregenden Diskussionen danken.

Danken möchte ich auch allen ehemaligen und gegenwärtigen Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Prof. Christian Hackenberger. Einige von ihnen verdienen eine besondere Erwähnung: Hier sei zunächst die äußerst produktive und kollegiale Zusammenarbeit mit **Dr. Jordi Bertran-Vicente** bei der Entwicklung von Methoden zur Analyse von Cysteinphosphorylierungen zu nennen. **Anett Hauser** danke ich für die wertvolle Unterstützung bei der Synthese labil phosphorylierter Peptide. Die gemeinsamen zum Teil sehr kräftezehrenden Arbeiten zur Lysinphosphorylierung fielen in der Zusammenarbeit mit ihr deutlich leichter. **Marc-André Kasper** möchte ich für die äußerst interessante Kooperation bei der Charakterisierung des Antikörperwirkstoffkonjugates danken. Die Entwicklung neuer Lösungsansätze zur Krebstherapie stellt für mich immer noch eine der bedeutendsten Fragestellungen überhaupt dar. Umso mehr freut es mich in diesem Projekt involviert gewesen zu sein. Bei **Dr. Debash Bhowmick** bedanke ich mich für die interessante Zusammenarbeit bei der positionsspezifischen Einführung einer Cysteinphosphorylierung und den interkulturellen Dialog.

Mein besonderer Dank gilt Frau **Prof. Dr. Dorothea Fiedler** und ihrem gesamten Arbeitskreis. Die stetige Diskussionsbereitschaft und der sehr freundliche und konstruktive Dialog bildeten die Basis für eine erfolgreiche Zusammenarbeit. Die bemerkenswert optimistische Herangehensweise und das ausgesprochen angenehme Arbeitsklima waren immer wieder aufs Neue der Motor für Fortschritte bei der Entwicklung von Strategien zur Identifizierung endogener Pyrophosphorylierungen und halfen auch herbe Rückschläge zu überwinden. Weiterhin möchte ich mich bei **Dr. Lisa Mary Yates** für die Synthese von pyrophosphorylierten Peptiden und ersten Anreicherungen zur Identifizierung von pyrophosphorylierten Peptiden danken. Sie hat damit einen wichtigen Beitrag zur Identifizierung der ersten endogenen Proteinpyrophosphorylierungen geleistet. **Dr. Alan Marmelstein** danke ich für die freundschaftliche Zusammenarbeit bei der Charakterisierung verschiedener synthetischer Proteinpyrophosphorylierungen. Außerdem danke ich **Dr. Jeremy Morgan** und meinem Freund **Robert Harmel** für ihren unermüdlichen Einsatz und ihren immerwährenden Optimismus bei der Anreicherung endogener Proteinpyrophosphorylierungen.

Die Verfassung einer Dissertation ist nie nur das Produkt aus drei Jahren Forschung. Sie ist vielmehr das Resultat einer langfristigen Entwicklung. Daher möchte an dieser Stelle weiteren Personen danken, welche nachhaltig meinen Werdegang beeinflusst haben. Zu allererst seien **Prof. Dr. Michael Linscheid** und **Dr. Sebastian Beck** zu nennen, bei denen schon frühzeitig mein Interesse an der modernen Massenspektrometrie geweckt und wichtige Grundlagen für meine weitere wissenschaftliche Tätigkeit gelegt wurden.

Außerdem danke ich meinen Freunden **Dr. Sebastian Kitzig** und **Fabian Eisenreich** für die wichtige Unterstützung zu Beginn des Studiums. Ein besonderer Dank gilt Frau **Christina Braun** und den **Mitarbeitern des analytischen Labors** der **CLR-Berlin GmbH** für die Vermittlung wichtiger Fähigkeiten, wie dem fehlerfreien und parallelisierten Arbeiten, von denen meine Dissertation bis zuletzt profitierte.

Parallel zu meiner Promotionstätigkeit war ich als wissenschaftlicher Mitarbeiter für die **CLR-Berlin GmbH** tätig, ein Unternehmen, welches mich nun seit über 13 Jahren begleitet. An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei der Geschäftsleitung **Dr. Stefan Borchert** und der Leitung der Forschung und Entwicklung **Dr. Heiko Prade** für die Verlässlichkeit und Unterstützung auch in schwierigen Zeiten bedanken. Meinen Freunden und Kollegen **Anne Steinmüller**, **Ivonne Burger**, **Elvira Wurl**, **Maren Peters** und **Dirk Hofmeister** möchte ich für das angenehme und vertrauensvolle Arbeitsklima über all die Jahre danken. Allgemein danke ich sowohl den Mitarbeitern der CLR-Berlin GmbH als auch denen des FMPs für das Verständnis, welches mir entgegengebracht wurde und mir die Vereinbarkeit beider Tätigkeiten ermöglichte.

Außerdem danke ich meiner Tante **Helga Brunn** für die Korrektur aller meiner Abschlussarbeiten. Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern **Katrin** und **Wolfram Penkert** für die moralische und finanzielle Unterstützung während meines Studiums. Der erfolgreiche Abschluss meiner Chemielaborantenausbildung, die Absolvierung des Studiums und die Anfertigung dieser Arbeit wären ohne den Rückhalt meiner Familie nicht möglich gewesen. Sie haben zu jeder Zeit an mich geglaubt und mit liebevoller Fürsorge auf dem richtigen Weg gehalten.

Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre, dass ich die Dissertation selbständig und nur unter Verwendung der von mir gemäß § 7 Abs. 3 der Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät, veröffentlicht im Amtlichen Mitteilungsblatt der Humboldt-Universität zu Berlin Nr. 126/2014 am 18.11.2014 angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Darüber hinaus versichere ich, mich nicht anderweitig um einen Doktorgrad beworben zu haben, oder einen Doktorgrad zu besitzen. Die dem Verfahren zu Grunde liegende Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin habe ich zur Kenntnis genommen.

Berlin, den 20.12.2018

Martin Penkert

„Ich bin ein Berliner!“